

<p>2004-489014/47 B05 D16 E15 (D13) SUNG- 2002.11.13 SUNGENE GMBH & CO KGAA 2002.11.13 2002-1053112(+2002DE-1053112) (2004.06.03) C12N 9/02, A01H 5/00, C12N 15/53, C12P 23/00 Production of ketocarotenoids with low hydroxylated by-product content, for use e.g. in pigmenting feedstuffs, by culturing genetically modified organisms having modified ketolase activity C2004-182265 Addnl. Data: SAUER M, FLACHMANN R, KLEBSATTEL M, SCHOPFER C R</p>	<p>B(3-A, 4-E2E, 4-F1E, 4-F8E, 4-F9E, 4-F10E, 4-L5CE, 10-E4A, 10-F2) D(3-G1, 3-H1, 5-C, 5-H8, 5-H12B2, 5-H14A, 5-H14B3) E(10-E4C, 10-E4F, 10-F2A1, 11-M) .9</p> <p>specific sequence (A) of 258 aminoacids (given in the specification as SEQ. ID. NO. 2) or a sequence (A) derived from (A) by substitution, insertion or deletion of amino acids, provided that (A') has at least 42% homology with (A).</p> <p>INDEPENDENT CLAIMS are included for:</p> <p>(1) genetically modified organisms which:</p> <p>(a) show increased KLA activity compared with wild strains (or into which KLA activity is introduced if the wild strain has no KLA activity), having KLA activity due to (II); and/or</p> <p>(b) contain at least one transgenic nucleic acid encoding (A) or (A') or at least two endogenous nucleic acid sequences encoding (II);</p> <p>(2) new ketolases (II'), which contain:</p> <p>(a) a specific sequence (Ai) of 262 aminoacids (SEQ. ID. NO. 8) or a sequence (Ai') derived from (Ai) by substitution, insertion or deletion, provided that (Ai') has at least 70% homology with (Ai) and that a specific sequence of 262 aminoacids (SEQ. ID. NO. 4) is excluded;</p> <p>(b) a specific sequence (Aii) of 253 aminoacids (SEQ. ID. NO. 6) or a</p>
<p>NOVELTY Production of ketocarotenoids (I) involves culturing genetically modified organisms having modified ketolase (KLA) activity (compared with wild strains) due to a ketolase (II) containing a specific sequence (A) of 258 aminoacids (given in the specification as SEQ. ID. NO. 2) or a mutant sequence of (A), provided that (A') has at least 42% homology with (A).</p> <p>DETAILED DESCRIPTION Production of ketocarotenoids (I) involves culturing genetically modified organisms having modified ketolase (KLA) activity (compared with wild strains) due to a ketolase (II) containing a</p>	<p>DE 10253112-A+</p>

sequence (Aii') derived from (Aii) by substitution, insertion or deletion, provided that (Aii') has at least 70% homology with (Aii);

(c) a specific sequence (Aiii) of 253 aminoacids (SEQ. ID. NO. 12) or a sequence (Aiii') derived from (Aiii) by substitution, insertion or deletion, provided that (Aiii') has at least 70% homology with (Aiii) and that SEQ. ID. NO. 4 is excluded; or

(d) a specific sequence (Aiv) of 267 aminoacids (SEQ. ID. NO. 49) or a sequence (Aiv') derived from (Aiv) by substitution, insertion or deletion, provided that (Aiv') has at least 50% homology with (Aiv) and that a specific sequence of 267 aminoacids (SEQ. ID. NO. 47) is excluded, where all the sequences are defined in the specification;

(3) nucleic acids encoding (II'), provided that a specific sequence of 762 bases (SEQ. ID. NO. 5; sequence defined in the specification) is excluded; and

(4) the use as ketolase of proteins which contain SEQ. ID. NO. 4 (or a derived sequence having at least 70% homology with SEQ. ID. NO. 4), SEQ. ID. NO. 6 (or a derived sequence having at least 65% homology with SEQ. ID. NO. 6) or SEQ. ID. NO. 47 (or a derived sequence having at least 50% homology with SEQ. ID. NO. 47) and show KLA activity, where all the sequences are defined in the specification.

USE

(I) are natural antioxidants and pigments, especially useful (particularly in the case of (Ia)) as pigmenting additives in animal feed, specifically feed for trout, salmon or shrimps. The use of the (I)-producing genetically modified organisms (specifically microorganisms or plants) is claimed as feedstuffs or foodstuffs, in the production of (I)-containing extracts or for producing feed or food supplements.

ADVANTAGE

The process provides large amounts of (I) having a low content of hydroxylated by-products, especially in the case of (Ia).

SPECIFIC COMPOUNDS

Eight compounds (I) are specifically claimed, e.g. astaxanthin (Ia).

EXAMPLE

DNA encoding the whole primary ketolase sequence from *Nostoc* sp. strain PCC7120 was isolated, amplified by PCR and used to produce a plasmid pNOSTF-G. A plasmid pMCL-Crt-YTBZ/idi/gps,

|DE 10253112-A+I|

2004-489014/47	<p>for the synthesis of zeaxanthin in <i>Escherichia coli</i>, was constructed in 3 stages via the intermediate stages pMCL-CrtYIBZ and pMCL-CrtYIBX/idi, using the high copy number plasmid vector pMCL200. <i>Escherichia coli</i> strain TOP10 was transformed with the plasmids pNOSTF-G and pMCL-Crt-YIBZ/idi/gps to give carotenoid producing strain, which provided a culture supernatant containing 491 ng/ml astaxanthin (Ia), 186 ng/ml adonirubin and 120 ng canthaxanthin (i.e. the required ketocarotenoid (Ia) as main product). For comparison, a supernatant obtained using a strain producing a ketolase from <i>Haematococcus pluvialis</i> gave a culture supernatant containing 13 ng/ml (Ia), 102 ng/ml adoxanthin and 120 ng zeaxanthin (i.e. the hydroxylated by-product zeaxanthin as main product).</p> <p>TECHNOLOGY FOCUS Biotechnology - Preferred Organisms: The starting microorganisms produce carotenoids (naturally or by genetic supplementation), and are specifically microorganisms (especially bacteria, yeasts, algae or fungi) or plants. Specified in the claims are 23 preferred types of microorganisms (e.g. <i>Escherichia</i>, <i>Flavobacterium</i>, <i>Nostoc</i>,</p>	<p><i>Synechocystis</i>, <i>Hansenula</i>, <i>Fusarium</i> and <i>Dunaliella</i>); 28 preferred families of plants (e.g. <i>Ranunculaceae</i>, <i>Cannabaceae</i>, <i>Brassicaceae</i>, <i>Amaranthaceae</i>, <i>Solanaceae</i> and <i>Lamiaceae</i>); and about 100 preferred genera of plants (e.g. <i>Acacia</i>, <i>Calendula</i>, <i>Genitiana</i>, <i>Helianthus</i>, <i>Linum</i>, <i>Rhododendron</i>, <i>Spartium</i> and <i>Zinnia</i>).</p> <p>Preferred Process: Nucleic acids encoding (II) are introduced into the host organisms, preferably nucleic acids containing a specific sequence of 777 bases (SEQ. ID. NO. 1) from <i>Nostoc</i> sp. strain PCC7120. The modified microorganisms additionally show elevated hydroxylase and/or β-cyclase activity, preferably due to expression of at least one nucleic acid encoding hydroxylase and/or β-cyclase, especially using:</p> <p>(a) a nucleic acid encoding a hydroxylase having specific sequence of 322 amino acids (SEQ. ID. NO. 16) (or a derived sequence having at least 20% homology), the nucleic acid preferably having a specific sequence of 1608 bases (SEQ. ID. NO. 15) from <i>Haematococcus pluvialis</i>; and/or</p> <p>(b) a nucleic acid encoding a β-cyclase having specific sequence of 500 amino acids (SEQ. ID. NO. 18) (or a derived sequence having</p> <p>DE 10253112-A+I2</p>
----------------	--	--

at least 20% homology), the nucleic acid preferably having a specific sequence of 1650 bases (SEQ. ID. NO. 17) from *Lycopersicon esculentum*.
All sequences are defined in the specification.
The genetically modified organism is cultured, the organism is harvested and (I) is recovered from the product.
(101pp2400DwgNo.0/6)



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 102 53 112 A1** 2004.06.03

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **102 53 112.9**
(22) Anmeldetag: **13.11.2002**
(43) Offenlegungstag: **03.06.2004**

(51) Int Cl.⁷: **C12N 9/02**
C12N 15/53, C12P 23/00, A01H 5/00

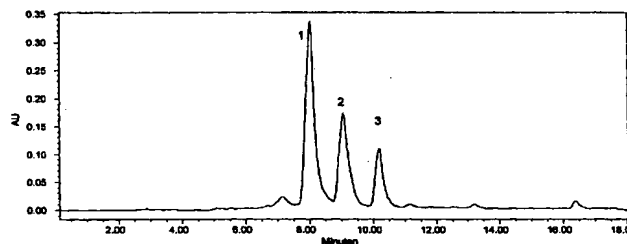
(71) Anmelder:
**SunGene GmbH & Co. KGaA, 06466 Gatersleben,
DE**

(72) Erfinder:
**Sauer, Matt, Dr., 06484 Quedlinburg, DE;
Flachmann, Ralf, Dr., 06484 Quedlinburg, DE;
Klebsattel, Martin, 06484 Quedlinburg, DE;
Schopfer, Christel Renate, Dr., 06484 Quedlinburg,
DE**

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden in genetisch veränderten Organismen**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität aufweisen, die genetisch veränderten Organismen sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur Herstellung von Ketocarotinoidextrakten.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität aufweisen, die genetisch veränderten Organismen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur Herstellung von Ketocarotinoidextrakten.

[0002] Carotinoide werden de novo in Bakterien, Algen, Pilzen und Pflanzen synthetisiert. Ketocarotinoide, also Carotinoide, die mindestens eine Keto-Gruppe enthalten, wie beispielsweise Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin sind natürliche Antioxidantien und Pigmente, die von einigen Algen und Mikroorganismen als Sekundärmetabolite produziert werden.

[0003] Aufgrund ihrer farbgebenden Eigenschaften werden die Ketocarotinoide und insbesondere Astaxanthin als Pigmentierhilfsstoffe in der Tierernährung, insbesondere in der Forellen-, Lachs- und Shrimpszucht verwendet.

[0004] Die Herstellung von Astaxanthin erfolgt heutzutage größtenteils durch chemische Syntheseverfahren. Natürliche Ketocarotinoide, wie beispielsweise natürliches Astaxanthin, werden heutzutage in biotechnologischen Verfahren in kleinen Mengen durch Kultivierung von Algen, beispielsweise *Haematococcus pluvialis* oder durch Fermentation von gentechnologisch optimierten Mikroorganismen und anschließender Isolierung gewonnen.

[0005] Ein wirtschaftliches biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von natürlichen Ketocarotinoiden ist daher von großer Bedeutung.

[0006] Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase und die entsprechenden Proteinsequenzen sind aus verschiedenen Organismen isoliert und annotiert worden, wie beispielsweise Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase aus *Agrobacterium aurantiacum* (EP 735 137, Accession NO: D58420), aus *Alcaligenes* sp. PC-1 (EP 735137, Accession NO: D58422), *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille und *Haematococcus pluvialis*, NIES-144 (EP 725137, WO 98/18910 und Lotan et al, FEBS Letters 1995, 364, 125–128, Accession NO: X86782 und D45881), *Paracoccus marcusii* (Accession NO: Y15112), *Synechocystis* sp. Strain PC6803 (Accession NO: NP_442491), *Bradyrhizobium* sp. (Accession NO: AF218415) und *Nostoc* sp. PCC 7120 (Kaneko et al, DNA Res. 2001, 8 (5), 205–213; Accession NO: AP003592, BAB74888).

[0007] EP 735 137 beschreibt die Herstellung von Xanthophyllen in Mikroorganismen, wie beispielsweise *E. coli* durch Einbringen von Ketolase-Genen (*crtW*) aus *Agrobacterium aurantiacum* oder *Alcaligenes* sp. PC-1 in Mikroorganismen.

[0008] Aus EP 725 137, WO 98/18910, Kajiwar et al. (Plant Mol. Biol. 1995, 29, 343–352) und Hirschberg et al. (FEBS Letters 1995, 364, 125–128) ist es bekannt, Astaxanthin durch Einbringen von Ketolase-Genen aus *Haematococcus pluvialis* (*crtW*, *crtO* oder *bkt*) in *E. coli* herzustellen.

[0009] Hirschberg et al. (FEBS Letters 1997, 404, 129–134) beschreiben die Herstellung von Astaxanthin in *Synechococcus* durch Einbringen von Ketolase-Genen (*crtO*) aus *Haematococcus pluvialis*. Sandmann et al. (Photochemistry and Photobiology 2001, 73 (5), 551–55) beschreiben ein analoges Verfahren, das jedoch zur Herstellung von Canthaxanthin führt und nur Spuren Astaxanthin liefert.

[0010] WO 98/18910 und Hirschberg et al. (Nature Biotechnology 2000, 18 (8), 888–892) beschreiben die Synthese von Ketocarotinoiden in Nektarien von Tabakblüten durch Einbringen des Ketolase-Gens aus *Haematococcus pluvialis* (*crtO*) in Tabak.

[0011] WO 01/20011 beschreibt ein DNA Konstrukt zur Produktion von Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin, in Samen von Ölsaatzpflanzen wie Raps, Sonnenblume, Sojabohne und Senf unter Verwendung eines Samen-spezifischen Promotors und einer Ketolase aus *Haematococcus pluvialis*.

[0012] Alle im Stand der Technik beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden und insbesondere die beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Astaxanthin weisen den Nachteil auf, daß die transgenen Organismen eine große Menge an hydroxylierten Nebenprodukten, wie beispielsweise Zeaxanthin und Adonixanthin liefern.

[0013] Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen zur Verfügung zu stellen, bzw. weitere genetisch veränderte Organismen, die Ketocarotinoide herstellen, zur Verfügung zu stellen, die die vorstehend beschriebenen Nachteile des Standes der Technik in geringerem Maße oder nicht mehr aufweisen.

[0014] Demgemäß wurde ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden gefunden, indem man genetisch veränderte Organismen kultiviert, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität aufweisen und die veränderte Ketolase-Aktivität durch eine Ketolase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

[0015] Die erfindungsgemäßen Organismen wie beispielsweise Mikroorganismen oder Pflanzen sind vor-

zugsweise als Ausgangsorganismen natürlicherweise in der Lage, Carotinoide wie beispielsweise β -Carotin oder Zeaxanthin herzustellen, oder können durch genetische Veränderung, wie beispielsweise Umregulierung von Stoffwechselwegen oder Komplementierung in die Lage versetzt werden, Carotinoide wie beispielsweise β -Carotin oder Zeaxanthin herzustellen.

[0016] Einige Organismen sind als Ausgangs- oder Wildtyporganismen bereits in der Lage, Ketocarotinoide wie beispielsweise Astaxanthin oder Canthaxanthin herzustellen. Diese Organismen, wie beispielsweise *Haematococcus pluvialis*, *Paracoccus marcusii*, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Bacillus circulans*, *Chlorococcum*, *Phaffia rhodozyma*, Adonisröschen, *Neochloris wimmeri*, *Protosiphon botryoides*, *Scotiellopsis oocystiformis*, *Scenedesmus vacuolatus*, *Chlorella zofingiensis*, *Ankistrodesmus braunii*, *Euglena sanguinea*, *Bacillus atrophaeus*, *Blakeslea* weisen bereits als Ausgangs- oder Wildtyporganismus eine Ketolase-Aktivität auf.

[0017] In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden daher als Ausgangsorganismen Organismen verwendet, die bereits als Wildtyp oder Ausgangsorganismus eine Ketolaseaktivität aufweisen. In dieser Ausführungsform bewirkt die genetische Veränderung eine Erhöhung der Ketolase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp oder Ausgangsorganismus.

[0018] Unter Ketolase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Ketolase verstanden.

[0019] Unter einer Ketolase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten, β -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Keto-Gruppe einzuführen.

[0020] Insbesondere wird unter einer Ketolase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, β -Carotin in Canthaxanthin umzuwandeln.

[0021] Dementsprechend wird unter Ketolase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Ketolase umgesetzte Menge β -Carotin bzw. gebildete Menge Canthaxanthin verstanden.

[0022] Bei einer erhöhten Ketolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Ketolase die umgesetzte Menge β -Carotin bzw. die gebildete Menge Canthaxanthin erhöht.

[0023] Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Ketolase-Aktivität mindestens 5%, weiter bevorzugt mindestens 20%, weiter bevorzugt mindestens 50%, weiter bevorzugt mindestens 100%, bevorzugt mindestens 300%, noch bevorzugt mindestens 500%, insbesondere mindestens 600% der Ketolase-Aktivität des Wildtyps.

[0024] Unter dem Begriff "Wildtyp" wird erfindungsgemäß der entsprechende Ausgangsorganismus verstanden.

[0025] Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff "Organismus" der Ausgangsorganismus (Wildtyp) oder ein erfindungsgemäßer, genetisch veränderter Organismus oder beides verstanden werden.

[0026] Vorzugsweise und insbesondere in Fällen, in denen der Organismus oder der Wildtyp nicht eindeutig zugeordnet werden kann, wird unter "Wildtyp" für die Erhöhung oder Verursachung der Ketolase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität und die Erhöhung des Gehalts an Ketocarotinoiden jeweils ein Referenzorganismus verstanden.

[0027] Dieser Referenzorganismus ist für Mikroorganismen, die bereits als Wildtyp eine Ketolase Aktivität aufweisen, vorzugsweise *Haematococcus pluvialis*.

[0028] Dieser Referenzorganismus ist für Mikroorganismen, die als Wildtyp keine Ketolase Aktivität aufweisen, vorzugsweise *Blakeslea*.

[0029] Dieser Referenzorganismus ist für Pflanzen, die bereits als Wildtyp eine Ketolase-Aktivität aufweisen, vorzugsweise *Adonis aestivalis*, *Adonis flammeus* oder *Adonis annuus*, besonders bevorzugt *Adonis aestivalis*.

[0030] Dieser Referenzorganismus ist für Pflanzen, die als Wildtyp keine Ketolase-Aktivität in Blütenblätter aufweisen, vorzugsweise *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Tagetes lucida*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri*, *Tagetes minuta* oder *Tagetes campanulata*, besonders bevorzugt *Tagetes erecta*.

[0031] Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Organismen und in Wildtyp- bzw. Referenzorganismen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

[0032] Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in Pflanzen- oder Mikroorganismenmaterial erfolgt in Anlehnung an die Methode von Frazer et al., (J. Biol. Chem. 272 (10): 6128–6135, 1997). Die Ketolase-Aktivität in pflanzlichen oder Mikroorganismus-Extrakten wird mit den Substraten β -Carotin und Canthaxanthin in Gegenwart von Lipid (Sojalecithin) und Detergens (Natriumcholat) bestimmt. Substrat/Produkt-Verhältnisse aus den Ketolase-Assays werden mittels HPLC ermittelt.

[0033] Die Erhöhung der Ketolase-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Translations- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, gegenüber dem Wildtyp, beispielsweise durch Induzierung des Ketolase-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, in den Organismus.

[0034] Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, wird erfindungsge-

mäß in dieser Ausführungsform auch die Manipulation der Expression der Organismen eigenen endogenen Ketolasen verstanden. Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Ketolase kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine veränderte oder vorzugsweise erhöhte Expressionsrate mindestens eines endogenen Ketolase Gens zur Folge hat, kann durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

[0035] Es ist wie vorstehend beschrieben möglich, die Expression mindestens einer endogenen Ketolase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

[0036] Des weiteren kann eine erhöhte Expression mindestens eines endogenen Ketolase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein im Wildtyporganismus nicht vorkommendes oder modifiziertes Regulatorprotein mit dem Promotor dieser Gene in Wechselwirkung tritt.

[0037] Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

[0038] In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Ketolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

[0039] In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, durch Einbringen von Nukleinsäuren, die Ketolasen kodieren, in die Organismen, wobei die Ketolasen die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz enthalten, die eine Identität von mindestens 42% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

[0040] In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Ketolase-Gen vor, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

[0041] In dieser Ausführungsform weist der erfindungsgemäße genetisch veränderte Organismus dementsprechend mindestens eine exogene (= heterologe) Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, auf oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, auf, wobei die Ketolasen die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz enthalten, die eine Identität von mindestens 42% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

[0042] In einer anderen, bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden als Ausgangsorganismen Organismen verwendet, die als Wildtyp keine Ketolaseaktivität aufweisen.

[0043] In dieser bevorzugten Ausführungsform verursacht die genetische Veränderung die Ketolase-Aktivität in den Organismen. Der erfindungsgemäße genetisch veränderte Organismus weist somit in dieser bevorzugten Ausführungsform im Vergleich zum genetisch nicht veränderten Wildtyp eine Ketolase-Aktivität auf und ist somit vorzugsweise in der Lage, transgen eine Ketolase zu exprimieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

[0044] In dieser bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, analog zu der vorstehend beschriebenen Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, vorzugsweise durch Einbringen von Nukleinsäuren, die Ketolasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, in den Ausgangsorganismus.

[0045] Dazu kann in beiden Ausführungsformen prinzipiell jede Nukleinsäure, die eine Ketolase kodiert, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, verwendet werden.

[0046] Die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, führt im erfindungsgemäßen Verfahren überraschenderweise zu Ketocarotinoiden mit einer geringeren Menge an hydroxylierten Nebenprodukten als bei der Verwendung der im Stand der Technik verwendeten Ketolase-Gene.

[0047] Alle in der Beschreibung erwähnten Nukleinsäuren können beispielsweise eine RNA-, DNA- oder cDNA-Sequenz sein.

[0048] Bei genomischen Ketolase-Sequenzen aus eukaryotischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall, dass der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entspre-

chenden Ketolase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

[0049] Beispiele für Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, und die entsprechenden Ketolasen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, die im erfindungsgemäßen Verfahren vorteilhaft verwendet werden können, sind beispielsweise Sequenzen aus

Nostoc sp. Strain PCC7120 (Accession NO: AP003592, BAB74888; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 1, Protein SEQ ID NO: 2),

Nostoc punctiforme ATTC 29133, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ AABC01000195, Basenpaar 55,604 bis 55,392 (SEQ ID NO: 3); Protein: Acc.-No. ZP 00111258 (SEQ ID NO: 4) (als putatives Protein annotiert) oder

Nostoc punctiforme ATTC 29133, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ AABC01000196, Basenpaar 140,571 bis 139,810 (SEQ ID NO: 5), Protein: (SEQ ID NO: 6) (nicht annotiert),

Synechococcus sp. WH 8102, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ_AABD01000001, Basenpaar 1,354,725–1,355,528 (SEQ ID NO: 46), Protein: Acc.-No. ZP,00115639 (SEQ ID NO: 47) (als putatives Protein annotiert),

oder von diesen Sequenzen abgeleitete Ketolasesequenzen wie beispielsweise die Ketolasen der Sequenz SEQ ID NO: 8 oder 10 und die entsprechenden kodierenden Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 7 oder SEQ ID NO: 9, die beispielsweise durch Variation/Mutation aus der Sequenz SEQ ID NO: 4 bzw. SEQ ID NO: 3 hervorgehen,

die Ketolasen der Sequenz SEQ ID NO: 12 oder 14 und die entsprechenden kodierenden Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 11 oder SEQ ID NO: 13, die beispielsweise durch Variation/Mutation aus der Sequenz SEQ ID NO: 6 bzw. SEQ ID NO: 5 hervorgehen, oder

die Ketolasen der Sequenz SEQ ID NO: 49 oder 51 und die entsprechenden kodierenden Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 48 oder SEQ ID NO: 50, die beispielsweise durch Variation bzw. Mutation aus der Sequenz SEQ ID NO: 47 bzw. SEQ ID NO: 46 hervorgehen.

[0050] Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können, lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der vorstehend beschriebenen Sequenzen SEQ ID NO: 2 leicht auffinden.

[0051] Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von den Sequenzen SEQ ID NO: 1 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

[0052] Die Hybridisierung kann unter moderaten (geringe Stringenz) oder vorzugsweise unter stringenten (hohe Stringenz) Bedingungen erfolgen.

[0053] Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: *Molecular Cloning (A Laboratory Manual)*, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31–9.57 oder in *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1–6.3.6 beschrieben.

[0054] Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrilles ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit 2X SSC bei 50°C) und solchen mit hoher Stringenz (mit 0.2X SSC bei 50°C, bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M Natriumchlorid, pH 7.0).

[0055] Darüberhinaus kann die Temperatur während des Waschschrilles von moderaten Bedingungen bei Raumtemperatur, 22°C, bis zu stringenten Bedingungen bei 65°C angehoben werden.

[0056] Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50% Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt.

[0057] Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschrille sind infolge gegeben:

(1) Hybridisierungsbedingungen mit zum Beispiel

(i) 4X SSC bei 65°C, oder

(ii) 6X SSC bei 45°C, oder

(iii) 6X SSC bei 68°C, 100 mg/ml denaturierter Fischsperma-DNA, oder

(iv) 6X SSC, 0.5% SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA bei 68°C, oder

(v) 6X SSC, 0.5% SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA, 50% Formamid bei 42°C, oder

(vi) 50% Formamid, 4X SSC bei 42°C, oder

(vii) 50% (vol/vol) Formamid, 0.1% Rinderserumalbumin, 0.1% Ficoll, 0.1% Polyvinylpyrrolidon, 50 mM Na-

- triumphosphatpuffer pH 6.5, 750 mM NaCl, 75 mM Natriumcitrat bei 42°C, oder
 (viii) 2X oder 4X SSC bei 50°C (moderate Bedingungen), oder
 (ix) 30 bis 40% Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42° (moderate Bedingungen).
 (2) Waschschritte für jeweils 10 Minuten mit zum Beispiel
 (i) 0.015 M NaCl/0.0015 M Natriumcitrat/0.1% SDS bei 50°C, oder
 (ii) 0.1X SSC bei 65°C, oder
 (iii) 0.1X SSC, 0.5% SDS bei 68°C, oder
 (iv) 0.1X SSC, 0.5% SDS, 50% Formamid bei 42°C, oder
 (v) 0.2X SSC, 0.1% SDS bei 42°C, oder
 (vi) 2X SSC bei 65°C (moderate Bedingungen).

[0058] In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren bringt man Nukleinsäuren ein, die eine Ketolase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 60%, vorzugsweise mindestens 65%, vorzugsweise mindestens 70%, bevorzugter mindestens 75%, bevorzugter mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95%, besonders bevorzugt mindestens 98% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist.

[0059] Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die wie vorstehend beschrieben durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz, die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

[0060] Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, er durch Thr.

[0061] Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

[0062] Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.

[0063] Unter Identität zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinlänge verstanden, insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der Vector NTI Suite 7.1 Software der Firma Informax (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer.

[0064] Comput Appl. Biosci. 1989 Apr; 5 (2): 151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Multiple alignment parameter:

Gap opening penalty	10
Gap extension penalty	10
Gap separation penalty range	8
Gap separation penalty	off
% identity for alignment delay	40
Residue specific gaps	off
Hydrophilic residue gap	off
Transition weighing	0

Pairwise alignment parameter:

FAST algorithm on	K-tuple size 1
Gap penalty 3	Window size 5
Number of best diagonals 5	

[0065] Unter einer Ketolase, die eine Identität von mindestens 42% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, wird dementsprechend eine Ketolase verstanden, die bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 2, insbesondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 42% aufweist.

[0066] Beispielsweise weist nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz die Sequenz der Ketolase aus Nostoc punctiforme ATTC 29133 (SEQ ID NO: 4) mit der Sequenz der Ketolase aus Nostoc sp. Strain PCC7120 (SEQ ID NO: 2) eine Identität von 65% auf.

- [0067] Die Sequenz der zweiten Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATTC 29133 (SEQ ID NO: 6) weist mit der Sequenz der Ketolase aus *Nostoc sp.* Strain PCC7120 (SEQ ID NO: 2) beispielsweise eine Identität von 58% auf.
- [0068] Die Sequenz der Ketolase aus *Synechococcus sp.* WH 8102 (SEQ ID NO: 47) weist mit der Sequenz der Ketolase aus *Nostoc sp.* Strain PCC7120 (SEQ ID NO: 2) beispielsweise eine Identität von 44% auf.
- [0069] Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.
- [0070] Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der Organismusspezifischen "codon usage" häufig verwendet werden. Die "codon usage" lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.
- [0071] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 1, in den Organismus ein.
- [0072] Alle vorstehend erwähnten Ketolase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896–897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.
- [0073] Die Sequenz der Ketolase aus *Nostoc sp.* Strain PCC7120 (SEQ ID NO: 2) weist mit den Sequenzen der Ketolasen die in den Verfahren des Standes der Technik verwendet werden eine Identität von 39% (*Agrobacterium aurantiacum* (EP 735 137, Accession NO: D58420), 40% (*Alcaligenes sp.* PC-1 (EP 735137, Accession NO: D58422) und 20 bis 21% (*Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille und *Haematococcus pluvialis*, NIES-144 (EP 725137, WO 98/18910 und Lotan et al, FEBS Letters 1995, 364, 125–128, Accession NO: X86782 und D45881) auf.
- [0074] In einer bevorzugten Ausführungsform werden Organismen kultiviert, die gegenüber dem Wildtyp zusätzlich zur erhöhten Ketolase-Aktivität eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und/oder β -Cyclase-Aktivität aufweisen.
- [0075] Unter Hydroxylase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Hydroxylase verstanden.
- [0076] Unter einer Hydroxylase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten, β -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Hydroxy-Gruppe einzuführen.
- [0077] Insbesondere wird unter einer Hydroxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, β -Carotin in Zeaxanthin oder Canthaxanthin in Astaxanthin umzuwandeln.
- [0078] Dementsprechend wird unter Hydroxylase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase umgesetzte Menge β -Carotin oder Canthaxanthin bzw. gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin verstanden.
- [0079] Bei einer erhöhten Hydroxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase die umgesetzte Menge β -Carotin oder Canthaxanthin bzw. die gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin erhöht.
- [0080] Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität mindestens 5%, weiter bevorzugt mindestens 20%, weiter bevorzugt mindestens 50%, weiter bevorzugt mindestens 100%, bevorzugter mindestens 300%, noch bevorzugter mindestens 500%, insbesondere mindestens 600% der Hydroxylase-Aktivität des Wildtyps.
- [0081] Unter β -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer β -Cyclase verstanden.
- [0082] Unter einer β -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen β -Ionon-Ring zu überführen.
- [0083] Insbesondere wird unter einer β -Cyclase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, γ -Carotin in β -Carotin umzuwandeln.
- [0084] Dementsprechend wird unter β -Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein β -Cyclase umgesetzte Menge γ -Carotin bzw. gebildete Menge β -Carotin verstanden.
- [0085] Bei einer erhöhten β -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein β -Cyclase die umgesetzte Menge an Lycopin bzw. γ -Carotin oder die gebildete Menge an γ -Carotin aus Lycopin bzw. die gebildete Menge an β -Carotin aus γ -Carotin erhöht.
- [0086] Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität mindestens 5%, weiter bevorzugt mindestens 20%, weiter bevorzugt mindestens 50%, weiter bevorzugt mindestens 100%, bevorzugter mindestens 300%, noch bevorzugter mindestens 500%, insbesondere mindestens 600% der β -Cyclase-Aktivität des Wildtyps.
- [0087] Die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Organismen und in Wildtyp- bzw. Referenzorganismen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen: Die Aktivität der

Hydroxylase wird nach Bouvier et al. (Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328) in vitro bestimmt. Es wird zu einer bestimmten Menge an Organismusextrakt Ferredoxin, Ferredoxin-NADP Oxidoreductase, Katalase, NADPH sowie β -Carotin mit Mono- und Digalaktosylglyzeriden zugegeben.

[0088] Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, Keller, d'Harlingue und Camara (Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.; Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328):

[0089] Der in-vitro Assay wird in einem Volumen von 0.250 ml durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), 0.025 mg Ferredoxin von Spinat, 0.5 Einheiten Ferredoxin-NADP+ Oxidoreduktase von Spinat, 0.25 mM NADPH, 0.010 mg β -Carotin (in 0.1 mg Tween 80 emulgiert), 0.05 mM einer Mischung von Mono- und Digalaktosylglyzeriden (1:1), 1 Einheit Katalase, 200 Mono- und Digalaktosylglyzeriden (1:1), 0.2 mg Rinderserumalbumin und Organismusextrakt in unterschiedlichem Volumen. Die Reaktionsmischung wird 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Reaktionsprodukte werden mit organischem Lösungsmittel wie Aceton oder Chloroform/Methanol (2:1) extrahiert und mittels HPLC bestimmt.

[0090] Die Bestimmung der β -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Organismen und in Wildtyp- bzw. Referenzorganismen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

[0091] Die Aktivität der β -Cyclase wird nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185 (1) (1992) 9-15) in vitro bestimmt. Es werden zu einer bestimmten Menge an Organismusextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stromaprotein von Paprika, NADP+, NADPH und ATP zugegeben.

[0092] Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der β -Cyclase-Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of carotenoid cyclase inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346 (1) (1997) 53-64): Der in-vitro Assay wird in einem Volumen von 250 μ l Volumen durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Organismusextrakt, 20 nM Lycopin, 250 μ g an chromoplastidärem Stromaprotein aus Paprika, 0.2 mM NADP+, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 10 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

[0093] Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185 (1) (1992) 9-15).

[0094] Die Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität und/oder β -Cyclase-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression von Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase, und/oder von Nukleinsäuren, kodierend eine β -Cyclase, gegenüber dem Wildtyp.

[0095] Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase, und/oder die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Induzierung des Hydroxylase-Gens und/oder β -Cyclase-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Hydroxylase-Genkopien und/oder β -Cyclase-Genkopien, also durch Einbringen mindestens einer Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, und/oder mindestens einer Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, in den Organismus.

[0096] Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase und/oder β -Cyclase, wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Organismus eigenen endogenen Hydroxylase und/oder β -Cyclase verstanden.

[0097] Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Hydroxylasen und/oder β -Cyclasen kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

[0098] Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen Hydroxylase und/oder β -Cyclase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

[0099] Des weiteren kann eine veränderte bzw. erhöhte Expression eines endogenen Hydroxylase- und/oder β -Cyclase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein im nicht transformierten Organismus nicht vorkommendes Regulator-Protein mit dem Promotor dieses Gens in Wechselwirkung tritt.

[0100] Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

[0101] In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, in den Organismus.

[0102] Dazu kann prinzipiell jedes Hydroxylase-Gen bzw. jedes β -Cyclase-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine Hydroxylase und jede Nukleinsäure, die eine β -Cyclase kodiert, verwendet werden.

[0103] Bei genomischen Hydroxylase- bzw. β -Cyclase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryotischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall, dass der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende Hydroxylase bzw. β -Cyclase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs, zu verwenden.

[0104] Ein Beispiel für ein Hydroxylase-Gen ist eine Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, aus *Haemotococcus pluvialis*, Accession AX038729, WO 0061764; (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 15, Protein: SEQ ID NO: 16).

[0105] Ein Beispiel für ein β -Cyclase-Gen ist eine Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase aus Tomate (Accession X86452). (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 17, Protein: SEQ ID NO: 18).

[0106] In den erfindungsgemäßen bevorzugten transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Hydroxylase-Gen und/oder β -Cyclase-Gen vor.

[0107] In dieser bevorzugten Ausführungsform weist der genetisch veränderte Organismus beispielsweise mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine β -Cyclase, auf.

[0108] Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Hydroxylase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 16 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30%, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 16, und die die enzymatische Eigenschaft einer Hydroxylase aufweisen.

[0109] Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID NO: 16 leicht auffinden.

[0110] Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 15 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

[0111] In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Hydroxylase der Sequenz SEQ ID NO: 16.

[0112] Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

[0113] Bevorzugt werden dafür solche Kodons verwendet, die entsprechend des Organismusspezifischen "codon usage" häufig verwendet werden. Dieser "codon usage" lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

[0114] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 15, in den Organismus ein.

[0115] Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als β -Cyclase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 18 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30%, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 18, und die die enzymatische Eigenschaft einer β -Cyclase aufweisen.

[0116] Weitere Beispiele für β -Cyclasen und β -Cyclase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID NO: 18 leicht auffinden.

[0117] Weitere Beispiele für β -Cyclasen und β -Cyclase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 17 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

[0118] In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der β -Cyclase der Sequenz SEQ. ID. NO: 18.

[0119] Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

[0120] Bevorzugt werden dafür solche Kodons verwendet, die entsprechend des Organismusspezifischen "codon usage" häufig verwendet werden. Dieser "codon usage" lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

[0121] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 17 in den Organismus ein.

[0122] Alle vorstehend erwähnten Hydroxylase-Gene oder β -Cyclase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896–897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lecken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

[0123] Besonders bevorzugt werden im erfindungsgemäßen Verfahren genetisch veränderte Organismen mit folgende Kombinationen genetischer Veränderungen verwendet:

Genetisch veränderte Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität und eine erhöhte R-Cyclase-Aktivität aufweisen und

genetisch veränderte Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine erhöhte R-Cyclase-Aktivität aufweisen.

[0124] Die Herstellung dieser genetisch veränderten Organismen kann, wie nachstehend beschrieben, beispielsweise durch Einbringen einzelner Nukleinsäurekonstrukte (Expressionskassetten) oder durch Einbringen von Mehrfachkonstrukten erfolgen, die bis zu zwei oder drei der beschriebenen Aktivitäten enthalten.

[0125] Unter Organismen werden erfindungsgemäß vorzugsweise Organismen verstanden, die als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen natürlicherweise oder durch genetische Komplementierung und/oder Umregulierung der Stoffwechselwege in der Lage sind, Carotinoide, insbesondere (3-Carotin und/oder Zeaxanthin und/oder Neoxanthin und/oder Violaxanthin und/oder Lutein herzustellen.

[0126] Weiter bevorzugte Organismen weisen als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen bereits eine Hydroxylase-Aktivität auf und sind somit als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen in der Lage, Zeaxanthin herzustellen.

[0127] Bevorzugte Organismen sind Pflanzen oder Mikroorganismen, wie beispielsweise Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.

[0128] Als Bakterien können sowohl Bakterien verwendet werden, die aufgrund des Einbringens von Genen der Carotinoidbiosynthese eines Carotinoid-produzierenden Organismus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren, wie beispielsweise Bakterien der Gattung *Escherichia*, die beispielsweise crt-Gene aus *Erwinia* enthalten, als auch Bakterien, die von sich aus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren wie beispielsweise Bakterien der Gattung *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Nostoc* oder Cyanobakterien der Gattung *Synechocystis*.

[0129] Bevorzugte Bakterien sind *Escherichia coli*, *Erwinia hericicola*, *Erwinia uredovora*, *Agrobacterium aurantiacum*, *Alcaligenes* sp. PC-1, *Flavobacterium* sp. strain R1534, das *Cyanobacterium Synechocystis* sp. PCC6803, *Paracoccus marcusii* oder *Paracoccus carotinifaciens*.

[0130] Bevorzugte Hefen sind *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia* oder *Phaffia*. Besonders bevorzugte Hefen sind *Xanthophyllomyces dendrorhous* oder *Phaffia rhodozyma*.

[0131] Bevorzugte Pilze sind *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Blakeslea*, *Phycomyces*, *Fusarium* oder weitere in *Indian Chem. Engr. Section B. Vol. 37, No. 1, 2 (1995)* auf Seite 15, Tabelle 6 beschriebene Pilze.

[0132] Bevorzugte Algen sind Grünalgen, wie beispielsweise Algen der Gattung *Haematococcus*, *Phaedactylum tricornutum*, *Volvox* oder *Dunaliella*. Besonders bevorzugte Algen sind *Haematococcus puvialis* oder *Dunaliella bardawil*.

[0133] Weitere brauchbare Mikroorganismen und deren Herstellung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind beispielsweise aus der DE-A-199 16 140 bekannt, worauf hiermit Bezug genommen wird.

[0134] Besonders bevorzugte Pflanzen sind Pflanzen ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Iliaceae oder Lamiaceae.

[0135] Ganz besonders bevorzugte Pflanzen sind ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen *Marigold*, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Acacia*, *Aconitum*, *Adonis*, *Amica*, *Aquilegia*, *Aster*, *Astragalus*, *Bignonia*, *Calendula*, *Caltha*, *Campanula*, *Canna*, *Centaurea*, *Cheiranthus*, *Chrysanthemum*, *Citrus*, *Crepis*, *Grocus*, *Curcubita*, *Cytisus*, *Delonia*, *Delphinium*, *Dianthus*, *Dimorphotheca*, *Doronicum*, *Eschscholtzia*, *Forsythia*, *Fremontia*, *Gazania*, *Gelsemium*, *Genista*, *Gentiana*, *Geranium*, *Gertiera*, *Geum*, *Grevillea*, *Helenium*, *Helianthus*, *Hepatica*, *Heracleum*, *Hibiscus*, *Heliopsis*, *Hypericum*, *Hypochoeris*, *Impatiens*, *Iris*, *Jacaranda*, *Kerria*, *Laburnum*, *Lathyrus*, *Leontodon*, *Lilium*, *Linum*, *Lotus*, *Lycopersicon*, *Lysimachia*, *Marattia*, *Medicago*, *Mimulus*,

Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapsis, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder Zinnia, besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula, Lycopersicon, Rosa, Calendula, Physalis, Medicago, Helianthus, Chrysanthemum, Aster, Tulipa, Narcissus, Petunia, Geranium, Tropaeolum oder Adonis.

[0136] Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der genetisch veränderten Organismen ein Ernten der Organismen und weiter bevorzugt zusätzlich ein Isolieren von Ketocarotinoiden aus den Organismen angeschlossen.

[0137] Das Ernten der Organismen erfolgt in an sich bekannter Weise dem jeweiligen Organismus entsprechend. Mikroorganismen, wie Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze oder Pflanzenzellen, die durch Fermentation in flüssigen Nährmedien kultiviert werden, können beispielsweise durch Zentrifugieren, Dekantieren oder Filtrieren abgetrennt werden. Pflanzen werden in an sich bekannter Weise auf Nährböden gezogen und entsprechend geerntet.

[0138] Die Kultivierung der genetisch veränderten Mikroorganismen erfolgt bevorzugt in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Kultivierungstemperatur von mindestens etwa 20°C, wie z.B. 20°C bis 40°C, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9. Bei genetisch veränderten Mikroorganismen erfolgt vorzugsweise zunächst die Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff und in einem Komplexmedium, wie z.B. TB- oder LB-Medium bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 20°C oder mehr, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9, bis eine ausreichende Zelldichte erreicht ist. Um die Oxidationsreaktion besser steuern zu können, bevorzugt man die Verwendung eines induzierbaren Promotors. Die Kultivierung wird nach Induktion der Ketolase-expression in Gegenwart von Sauerstoff, z.B. 12 Stunden bis 3 Tage, fortgesetzt.

[0139] Die Isolierung der Ketocarotinoide aus der geernteten Biomasse erfolgt in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Extraktion und gegebenenfalls weiterer chemische oder physikalischer Reinigungsprozesse, wie beispielsweise Fällungsmethoden, Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie Rektifizierverfahren oder physikalische Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie.

[0140] Wie nachstehend erwähnt, können die Ketocarotinoide in den erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Pflanzen vorzugsweise in verschiedenen Pflanzengeweben, wie beispielsweise Samen, Blätter, Früchte, Blüten, insbesondere in Blütenblättern spezifisch hergestellt werden.

[0141] Die Isolierung von Ketocarotinoiden aus den geernteten Blütenblättern erfolgt in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Trocknung und anschließender Extraktion und gegebenenfalls weiterer chemischer oder physikalischer Reinigungsprozesse, wie beispielsweise Fällungsmethoden, Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie Rektifizierverfahren oder physikalische Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie. Die Isolierung von Ketocarotinoiden aus den Blütenblättern erfolgt beispielsweise bevorzugt durch organische Lösungsmittel wie Aceton, Hexan, Ether oder tert.-Methylbutylether.

[0142] Weitere Isolierverfahren von Ketocarotinoiden, insbesondere aus Blütenblättern, sind beispielsweise in Egger und Kleinig (Phytochemistry (1967) 6, 437–440) und Egger (Phytochemistry (1965) 4, 609–618) beschrieben.

[0143] Vorzugsweise sind die Ketocarotinoide ausgewählt aus der Gruppe Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinonon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin.

[0144] Ein besonders bevorzugtes Ketocarotinoid ist Astaxanthin.

[0145] Je nach verwendetem Organismus fallen die Ketocarotinoide in freier Form oder als Fettsäureester an.

[0146] In Blütenblättern von Pflanzen fallen die Ketocarotinide im erfindungsgemäßen Verfahren in Form ihrer Mono- oder Diester mit Fettsäuren an. Einige nachgewiesene Fettsäuren sind z.B. Myristinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure, Linolensäure, und Laurinsäure (Kamata und Simpson (1987) Comp. Biochem. Physiol. Vol. 86B(3), 587–591).

[0147] Die Herstellung der Ketocarotinoide kann in der ganzen Pflanze oder in einer bevorzugten Ausführungsform spezifisch in Pflanzengeweben, die Chromoplasten enthalten, erfolgen. Bevorzugte Pflanzengewebe sind beispielsweise Wurzeln, Samen, Blätter, Früchte, Blüten und insbesondere Nektarien und Blütenblätter, die auch Petalen bezeichnet werden.

[0148] In einer besonderen bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Blüten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

[0149] Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors erfolgt. Beispielsweise werden dazu die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt funktionell verknüpft mit einem blütenspezifischen Promotor in die Pflanze eingebracht.

[0150] In einer weiteren, besonderen bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Früchten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

[0151] Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines

fruchtspezifischen Promotors erfolgt. Beispielsweise werden dazu die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt funktionell verknüpft mit einem fruchtspezifischen Promotor in die Pflanze eingebracht.

[0152] In einer weiteren, besonders bevorzugten, Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Samen die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

[0153] Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors erfolgt. Beispielsweise werden dazu die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt funktionell verknüpft mit einem samenspezifischen Promotor in die Pflanze eingebracht.

[0154] Das Targeting in die Chromoplasten erfolgt durch ein funktionell verknüpftes plastidäres Transitpeptid.

[0155] Im folgenden wird exemplarisch die Herstellung genetisch veränderter Pflanzen mit erhöhter oder verursachter Ketolase-Aktivität beschrieben. Die Erhöhung weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise der Hydroxylase-Aktivität und/oder der β -Cyclase-Aktivität kann analog unter Verwendung von Nukleinsäuresequenzen, kodierend eine Hydroxylase bzw. β -Cyclase anstelle von Nukleinsäuresequenzen, kodierend eine Ketolase, erfolgen. Die Transformation kann bei den Kombinationen von genetischen Veränderungen einzeln oder durch Mehrfachkonstrukte erfolgen.

[0156] Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt vorzugsweise durch Transformation der Ausgangspflanzen, mit einem Nukleinsäurekonstrukt, das die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase enthält, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

[0157] Diese Nukleinsäurekonstrukte, in denen die kodierende Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten, werden im folgenden auch Expressionskassetten genannt.

[0158] Vorzugsweise enthalten die Regulationssignale einen oder mehrere Promotoren, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

[0159] Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

[0160] Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten und Vektoren für Pflanzen und Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen, sowie die transgenen Pflanzen selbst beschrieben.

[0161] Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten, aber nicht darauf beschränkten Sequenzen, sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärkern wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693–8711).

[0162] Als Promotor der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann.

[0163] "Konstitutiver" Promotor meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten.

[0164] Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21: 285–294; Odell et al. (1985) Nature 313: 810–812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140: 281–288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6: 221–228), der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8: 2195–2202), den Triose-Phosphat Translokator (TPT) Promotor aus Arabidopsis thaliana Acc.-No. AB006698, Basenpaar 53242 bis 55281; das Gen beginnend ab by 55282 ist mit "phosphate/triose-phosphate translocator" annotiert, oder den 34S Promotor aus Figwort mosaic virus Acc.-No. X16673, Basenpaar 1 bis 554.

[0165] Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der pds Promotor (Pecker et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89: 4962–4966) oder der "Rubisco small subunit (SSU)"-Promotor (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor

(Holtort S et al. (1995) *Plant Mol Biol* 29: 637–649), der Ubiquitin 1 Promotor (Christessen et al. (1992) *Plant Mol Biol* 18: 675–689; Bruce et al. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9692–9696), der Smas Promotor, der Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), der Pnit-Promoter (Y07648.L, Hillebrand et al. (1998), *Plant. Mol. Biol.* 36, 89–99, Hillebrand et al. (1996), *Gene*, 170, 197–200) sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist.

[0166] Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 89–108), durch den die Expression des Ketolase-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) *Plant Mol Biol* 22: 361–366), ein durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatr et al. (1992) *Plant J* 2: 397–404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden.

[0167] Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch Biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) *Plant Mol Biol* 22: 361–366), der hitreinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814), der licht-induzierbare PPDK Promotor oder der verwundungsinduzierte pinII-Promoter (EP 375091).

[0168] Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, b-1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) *Neth J Plant Pathol* 89: 245–254; Uknes, et al. (1992) *The Plant Cell* 4: 645–656; Van Loon (1985) *Plant Mol Viral* 4: 111–116; Marineau et al. (1987) *Plant Mol Biol* 9: 335–342; Matton et al. (1987) *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2: 325–342; Somssich et al. (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2427–2430; Somssich et al. (1988) *Mol Gen Genetics* 2: 93–98; Chen et al. (1996) *Plant J* 10: 955–966; Zhang and Sing (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2507–2511; Warner, et al. (1993) *Plant J* 3: 191–201; Siebertz et al. (1989) *Plant Cell* 1: 961–968 (1989).

[0169] Umfasst sind auch verwundungsinduzierbare Promotoren wie der des pinII-Gens (Ryan (1990) *Ann Rev Phytopath* 28: 425–449; Duan et al. (1996) *Nat Biotech* 14: 494–498), des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) *Mol Gen Genet* 215: 200–208), des Systemin-Gens (McGurl et al. (1992) *Science* 225: 1570–1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) *Plant Mol Biol* 22: 783–792; Eckelkamp et al. (1993) *FEBS Letters* 323: 73–76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) *The Plant J* 6 (2): 141–150) und dergleichen.

[0170] Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise fruchtreifung-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der Fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die gewebespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

[0171] Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Ketocarotinoiden bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Bevorzugt sind beispielsweise Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Petalen, Sepalen, Blüten, Blätter, Stengel, Samen und Wurzeln und Kombinationen hieraus.

[0172] Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren sind beispielsweise der Patatin-Promotor Klasse I (B33) oder der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.

[0173] Blattspezifische Promotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) *EM-BO J* 8: 2445–2451).

[0174] Blütenspezifische Promotoren sind beispielsweise der Phytoen-Synthase Promotor (WO 92/16635) oder der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593), der AP3 Promoter aus *Arabidopsis thaliana* (siehe Beispiel 5), der CHRC-Promoter (Chromoplast-specific carotenoidassociated protein (CHRC) gene promoter aus *Cucumis sativus* Acc.-No. AF099501, Basenpaar 1 bis 1532), der EPSP Synthase Promotor (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene promoter aus *Petunia hybrida*, Acc.-No. M37029, Basenpaar 1 bis 1788), der PDS Promotor (Phytoene desaturase gene promoter aus *Solanum lycopersicum*, Acc.-No. U46919, Basenpaar 1 bis 2078), der DFR-A Promotor (Dihydroflavonol 4-reductase gene A promoter aus *Petunia hybrida*, Acc.-No. X79723, Basenpaar 32 bis 1902) oder der FBP1 Promotor (Floral Binding Protein 1 gene promoter aus *Petunia hybrida*, Acc.-No. L10115, Basenpaar 52 bis 1069).

[0175] Antheren-spezifische Promotoren sind beispielsweise der 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), der glob-I Promotor oder der g-Zein Promotor.

[0176] Samen-spezifische Promotoren sind beispielsweise der ACP05-Promotor (Acyl-carrier-Protein Gen, WO9218634), die Promotoren AtS1 und AtS3 von *Arabidopsis* (WO 9920775), der LeB4-Promotor von *Vicia faba* (WO 9729200 und US 06403371), der Napin-Promotor von *Brassica napus* (US 5608152; EP 255378;

US 5420034), der SBP-Promotor von *Vicia faba* (DE 9903432) oder die Maispromotoren End1 und End2 (WO 0011177).

[0177] Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind beschrieben in Rogers et al. (1987) *Meth in Enzymol* 153: 253–277; Schardl et al. (1987) *Gene* 61: 1–11 und Berger et al. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 8402–8406).

[0178] Besonders bevorzugt im erfindungsgemäßen Verfahren sind konstitutive, samenspezifische, fruchtspezifische, blütenspezifische und insbesondere blütenblattspezifische Promotoren.

[0179] Die vorliegende Erfindung betrifft daher insbesondere ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen blütenspezifischen oder insbesondere einen blütenblattspezifischen Promotor und eine Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

[0180] Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer vorstehend beschriebenen Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, und vorzugsweise einer zwischen Promotor und Nukleinsäure-Sequenz inserierten Nukleinsäure, die für ein plastidenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987), beschrieben sind.

[0181] Die vorzugsweise insertierte Nukleinsäuren, kodierend ein plastidäres Transitpeptid, gewährleisten die Lokalisation in Plastiden und insbesondere in Chromoplasten.

[0182] Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren Nukleinsäure-Sequenz für ein Ketolase-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chromoplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation der Ketolase in die Chromoplasten vom Ketolase-Teil enzymatisch abgespalten werden.

[0183] Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären *Nicotiana tabacum* Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco (rbcS) oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase als auch der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2) oder dessen funktionellem Äquivalent abgeleitet ist.

[0184] Besonders bevorzugt sind Nukleinsäure-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

pTP09

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTG
 TCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCT-
 CACTTTTTCCGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACACCTCCCGCCGCCG-
 TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCGTCTGTAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCT-
 CAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTCTGAGACTGCGGGATCC_BamHI

pTP10

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTG
 TCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCT-
 CACTTTTTCCGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACACCTCCCGCCGCCG-
 TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGCGTCTGTAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCT-
 CAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTCTGAGACTGCGCTGGATCC_BamHI

pTP11

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTG
 TCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCT-
 CACTTTTTCCGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACACCTCCCGCCGCCG-
 TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGCGTCTGTAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCT-
 CAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTCTGAGACTGCGGGGATCC_BamHI

[0185] Weitere Beispiele für ein plastidäres Transitpeptid sind das Transitpeptid der plastidären Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) aus *Arabidopsis thaliana* und das Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Ribulosebiphosphat Carboxylase (rbcS) aus Erbse (Guerineau, F, Woolston, S, Brooks, L, Mullineaux, P (1988) An expression cassette for targeting foreign proteins into the chloroplasts. Nucl. Acids Res. 16: 11380).

[0186] Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen.

[0187] Bevorzugt sind, wie vorstehend beschrieben, synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden.

[0188] Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

[0189] Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet vorzugsweise in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine kodierende Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäurekonstrukt und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

[0190] Beispiele für einen Terminator sind der 35S-Terminator (Guerineau et al. (1988) Nucl Acids Res. 16: 11380), der nos Terminator (Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. J Mol Appl Genet. 1982; 1 (6): 561-73) oder der ocs Terminator (Gielen, J, de Beuckeleer, M, Seurinck, J, Debroek, N, de Greve, H, Lemmers, M, van Montagu, M, Schell, J (1984)

The complete sequence of the TL-DNA of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiAchS. EMBO J. 3: 835–846).

[0191] Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primer-repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden.

[0192] Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

[0193] Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

[0194] Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet.

[0195] Dazu können an sich bekannte Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt werden.

[0196] Geeignete Methoden zur Transformation von Pflanzen sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone – die sogenannte "particle bombardment" Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der, vorstehend beschriebene, durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128–143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205–225 beschrieben.

[0197] Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711) oder besonders bevorzugt pSUN2, pSUN3, pSUN4 oder pSUNS (WO 02/00900).

[0198] Mit einem Expressionsplasmid transformierte *Agrobakterien* können in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer *Agrobakterien*-lösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

[0199] Zur bevorzugten Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, wird die fusionierte Expressionskassette, die eine Ketolase exprimiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19 oder insbesondere pSUNS und pSUN3 kloniert, der geeignet ist, in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert zu werden. Mit einem solchen Vektor transformierte *Agrobakterien* können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer *Agrobakterien*-lösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

[0200] Die Transformation von Pflanzen durch *Agrobakterien* ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15–38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthalten.

[0201] Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine Ketolase kodierenden Nukleinsäure wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71–119 (1993) beschrieben.

[0202] Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pJIT117 (Guerineau et al. (1988) Nucl. Acids Res. 16: 11380), pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in *Agrobakterien* replizieren können.

[0203] Im folgenden wird die Herstellung der erfindungsgemäßen genetisch veränderten Mikroorganismen näher beschrieben:

[0204] Die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase oder β -Hydroxylase oder β -Cyclase sind vorzugsweise in Expressionskonstrukte eingebaut, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine für ein erfindungsgemäßes Enzym kodierende Nukleinsäuresequenz; sowie Vektoren, umfassend wenigstens eines dieser Expressionskonstrukte.

[0205] Vorzugsweise umfassen solche erfindungsgemäßen Konstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen kodierenden Sequenz einen Promotor und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils operativ verknüpft mit der kodierenden Sequenz. Unter

einer "operativen Verknüpfung" versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

[0206] Beispiele für operativ verknüpfbare Sequenzen sind Targeting-Sequenzen sowie Translationsverstärker, Enhancer, Polyadenylierungssignale und dergleichen. Weitere regulative Elemente umfassen selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge und dergleichen.

[0207] Zusätzlich zu den artifiziellen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulationssequenz vor dem eigentlichen Strukturgen noch vorhanden sein. Durch genetische Veränderung kann diese natürliche Regulation gegebenenfalls ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht oder erniedrigt werden. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor das Strukturgen insertiert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Statt dessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert oder verringert wird. Die Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

[0208] Beispiele für brauchbare Promotoren in Mikroorganismen sind: *cos*-, *tac*-, *trp*-, *tet*-, *trp-tet*-, *lpp*-, *lac*-, *lpp-lac*-, *lacIq*-, *T7*-, *T5*-, *T3*-, *gal*-, *trc*-, *ara*-, *SP6*-, *lambda-PR*- oder im *lambda-PL*-Promotor, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden; sowie die gram-positiven Promotoren *amy* und *SPO2* oder die Hefepromotoren *ADC1*, *MFa*, *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH*. Besonders bevorzugt ist die Verwendung induzierbarer Promotoren, wie z.B. licht- und insbesondere temperaturinduzierbarer Promotoren, wie der *P_{HP}*-Promotor.

[0209] Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen verwendet werden. Darüber hinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

[0210] Die genannten regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Nukleinsäuresequenzen und die Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

[0211] Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen oder erniedrigen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

[0212] Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, kodierend eine Ketolase, β -Hydroxylase oder β -Cyclase sowie einem Terminator- oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

[0213] Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor insertiert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam – New York – Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannte Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus und Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden.

[0214] Als Beispiele für geeignete Expressionsvektoren können genannt werden:

[0215] Übliche Fusionsexpressionsvektoren, wie pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. und Johnson, K.S. (1988) *Gene* 67: 31–40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) und pRIT 5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), bei denen Glutathion-S-Transferase (GST), Maltose E-bindendes Protein bzw. Protein A an das rekombinante Zielprotein fusioniert wird.

[0216] Nicht-Fusionsprotein-Expressionsvektoren wie pTrc (Amann et al., (1988) *Gene* 69: 301–315) und pET 11d (Studier et al. *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60–89) oder pBluescript und pUC-Vektoren.

[0217] Hefe-Expressionsvektor zur Expression in der Hefe *S. cerevisiae*, wie pYepSec1 (Baldari et al., (1987) *Embo J.* 6: 229–234), pMFa (Kurjan und Herskowitz (1982) *Cell* 30: 933–943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) *Gene* 54: 113–123) sowie pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA).

[0218] Vektoren und Verfahren zur Konstruktion von Vektoren, die sich zur Verwendung in anderen Pilzen, wie filamentösen Pilzen, eignen, umfassen diejenigen, die eingehend beschrieben sind in: van den Hondel,

C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics of Fungi, J.F. Peberdy et al., Hrsg., S. 1–28, Cambridge University Press: Cambridge.

[0219] Baculovirus-Vektoren, die zur Expression von Proteinen in gezüchteten Insektenzellen (bspw. Sf9-Zellen) verfügbar sind, umfassen die pAc-Reihe (Smith et al., (1983) Mol. Cell Biol. 3: 2156–2165) und die pVL-Reihe (Lucklow und Summers (1989) Virology 170: 31–39).

[0220] Weitere geeignete Expressionssysteme für prokaryontische und eukaryotische Zellen sind in Kapitel 16 und 17 von Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T., Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 beschrieben.

[0221] Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Expressionskonstrukte bzw. Vektoren sind genetisch veränderte Mikroorganismen herstellbar, welche beispielsweise mit wenigstens einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert sind.

[0222] Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen erfindungsgemäßen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden, wie beispielsweise Co-Präzipitation, Protoplastenfusion, Elektroporation, retrovirale Transfektion und dergleichen, verwendet, um die genannten Nukleinsäuren im jeweiligen Expressionssystem zur Expression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, beschrieben.

[0223] Die Selektion erfolgreich transformierter Organismen kann durch Markergene erfolgen, die ebenfalls im Vektor oder in der Expressionskassette enthalten sind. Beispiele für solche Markergene sind Gene für Antibiotikaresistenz und für Enzyme, die eine farbgebende Reaktion katalysieren, die ein Anfärben der transformierten Zelle bewirkt. Diese können dann mittels automatischer Zellsortierung selektiert werden.

[0224] Erfolgreich mit einem Vektor transformierte Mikroorganismen, die ein entsprechendes Antibiotikaresistenzgen (z.B. G418 oder Hygromycin) tragen, lassen sich durch entsprechende Antibiotika-enthaltende Medien oder Nährböden selektieren. Markerproteine, die an der Zelloberfläche präsentiert werden, können zur Selektion mittels Affinitätschromatographie genutzt werden.

[0225] Die Kombination aus den Wirtsorganismen und den zu den Organismen passenden Vektoren, wie Plasmide, Viren oder Phagen, wie beispielsweise Plasmide mit dem RNA-Polymerase/Promoter-System, die Phagen 8 oder andere temperente Phagen oder Transposons und/oder weiteren vorteilhaften regulatorischen Sequenzen bildet ein Expressionssystem.

[0226] Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Organismen, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen Promotor und Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, und gegebenenfalls einen Terminator in das Genom des Ausgangsorganismus oder extrachromosomal in den Ausgangsorganismus einführt.

[0227] Die Erfindung betrifft ferner die genetisch veränderten Organismen, wobei die genetische Veränderung die Aktivität einer Ketolase

A für den Fall, dass der Wildtyporganismus bereits eine Ketolase-Aktivität aufweist, gegenüber dem Wildtyp erhöht und

B für den Fall, dass der Wildtyporganismus keine Ketolase-Aktivität aufweist, gegenüber dem Wildtyp verursacht

und die nach A erhöhte oder nach B verursachte Ketolase-Aktivität durch eine Ketolase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

[0228] Wie vorstehend ausgeführt erfolgt die Erhöhung oder Verursachung der Ketolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp vorzugsweise durch eine Erhöhung oder Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

[0229] In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt, wie vorstehend ausgeführt, die Erhöhung oder Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, durch Einbringen von Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, in die Pflanzen und damit vorzugsweise durch Überexpression oder transgene Expression von Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

[0230] Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Organismus, enthaltend mindestens eine

transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist. Dies ist der Fall, wenn der Ausgangsorganismus keine Ketolase oder eine endogen Ketolase aufweist und eine transgene Ketolase überexprimiert wird.

[0231] Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Organismus, enthaltend mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist. Dies ist der Fall, wenn der Ausgangsorganismus eine endogene Ketolase aufweist und die endogene Ketolase überexprimiert wird.

[0232] Besonders bevorzugte, genetisch veränderte Organismen weisen, wie vorstehend erwähnt, zusätzlich eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und/oder β -Cyclase-Aktivität gegenüber einem Wildtyporganismus auf. Weiter bevorzugte Ausführungsformen sind vorstehend im erfindungsgemäßen Verfahren beschrieben.

[0233] Unter Organismen werden erfindungsgemäß vorzugsweise Organismen verstanden, die als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen natürlicherweise oder durch genetische Komplementation und/oder Umregulierung der Stoffwechselwege in der Lage sind, Carotinoide, insbesondere β -Carotin und/oder Zeaxanthin und/oder Neoxanthin und/oder Violaxanthin und/oder Lutein herzustellen.

[0234] Weiter bevorzugte Organismen weisen als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen bereits eine Hydroxylase-Aktivität auf und sind somit als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen in der Lage, Zeaxanthin herzustellen.

[0235] Bevorzugte Organismen sind Pflanzen oder Mikroorganismen, wie beispielsweise Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.

[0236] Als Bakterien können sowohl Bakterien verwendet werden, die aufgrund des Einbringens von Genen der Carotinoidbiosynthese eines Carotinoid-produzierenden Organismus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren, wie beispielsweise Bakterien der Gattung *Escherichia*, die beispielsweise crt-Gene aus *Erwinia* enthalten, als auch Bakterien, die von sich aus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren wie beispielsweise Bakterien der Gattung *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Nostoc* oder Cyanobakterien der Gattung *Synechocystis*.

[0237] Bevorzugte Bakterien sind *Escherichia coli*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia uredovora*, *Agrobacterium aurantiacum*, *Alcaligenes* sp. PC-1, *Flavobacterium* sp. strain R1534, das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803, *Paracoccus marcusii* oder *Paracoccus carotinifaciens*.

[0238] Bevorzugte Hefen sind *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia* oder *Phaffia*. Besonders bevorzugte Hefen sind *Xanthophyllomyces dendrorhous* oder *Phaffia rhodozyma*.

[0239] Bevorzugte Pilze sind *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Blakeslea*, *Phycomyces*, *Fusarium* oder weitere in Indian Chem. Engr. Section B. Vol. 37, No. 1, 2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschriebene Pilze.

[0240] Bevorzugte Algen sind Grünalgen, wie beispielsweise Algen der Gattung *Haematococcus*, *Phaedactylum tricornatum*, *Volvox* oder *Dunaliella*. Besonders bevorzugte Algen sind *Haematococcus puvialis* oder *Dunaliella bardawil*.

[0241] Weitere brauchbare Mikroorganismen und deren Herstellung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind beispielsweise aus der DE-A-199 16 140 bekannt, worauf hiermit Bezug genommen wird.

[0242] Besonders bevorzugte Pflanzen sind Pflanzen ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Iliaceae oder Lamiaceae.

[0243] Ganz besonders bevorzugte Pflanzen sind ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen Marigold, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Acacia*, *Aconitum*, *Adonis*, *Arnica*, *Aquilegia*, *Aster*, *Astragalus*, *Bignonia*, *Calendula*, *Caltha*, *Campanula*, *Canna*, *Centaurea*, *Cheiranthus*, *Chrysanthemum*, *Citrus*, *Crepis*, *Crocus*, *Curcubita*, *Cytisus*, *Delonia*, *Delphinium*, *Dianthus*, *Dimorphotheca*, *Doronicum*, *Eschscholtzia*, *Forsythia*, *Fremontia*, *Gazania*, *Gelsemium*, *Genista*, *Gentiana*, *Geranium*, *Gerbera*, *Geum*, *Grevillea*, *Helenium*, *Helianthus*, *Hepatica*, *Heracleum*, *Hibiscus*, *Heliopsis*, *Hypericum*, *Hypochoeris*, *Impatiens*, *Iris*, *Jacaranda*, *Kerria*, *Laburnum*, *Lathyrus*, *Leontodon*, *Lilium*, *Linum*, *Lotus*, *Lycopersicon*, *Lysimachia*, *Marattia*, *Medicago*, *Mimulus*, *Narcissus*, *Oenothera*, *Osmanthus*, *Petunia*, *Photinia*, *Physalis*, *Phyteuma*, *Potentilla*, *Pyracantha*, *Ranunculus*, *Rhododendron*, *Rosa*, *Rudbeckia*, *Senecio*, *Silene*, *Silphium*, *Sinapsis*, *Sorbus*, *Spartium*, *Tecoma*, *Torenia*, *Tragopogon*, *Trollius*, *Tropaeolum*, *Tulipa*, *Tussilago*, *Ulex*, *Viola* oder *Zinnia*, besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen Marigold, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Lycopersicon*, *Rosa*, *Calendula*, *Physalis*, *Medicago*, *Helianthus*, *Chrysanthemum*, *Aster*, *Tulipa*, *Narcissus*, *Petunia*, *Geranium*, *Tropaeolum* oder *Adonis*.

[0244] Ganz besonders bevorzugte genetisch veränderte Pflanzen sind ausgewählt aus den Pflanzengattun-

gen Marigold, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Adonis*, *Lycopersicon*, *Rosa*, *Calendula*, *Physalis*, *Medicago*, *Helianthus*, *Chrysanthemum*, *Aster*, *Tulipa*, *Narcissus*, *Petunia*, *Geranium* oder *Tropaeolum*, wobei die genetisch veränderte Pflanze mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthält.

[0245] Die transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile, insbesondere deren Früchte, Samen, Blüten und Blütenblätter sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

[0246] Die genetisch veränderten Pflanzen können, wie vorstehend beschrieben, zur Herstellung von Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin verwendet werden.

[0247] Von Menschen und Tieren verzehrbare erfindungsgemäße, genetisch veränderte Organismen, insbesondere Pflanzen oder Pflanzenteile, wie insbesondere Blütenblätter mit erhöhtem Gehalt an Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin können auch beispielsweise direkt oder nach an sich bekannter Prozessierung als Nahrungsmittel oder Futtermittel oder als Futter- und Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden.

[0248] Ferner können die genetisch veränderten Organismen zur Herstellung von Ketocarotinoidhaltigen Extrakten der Organismen und/oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungsergänzungsmitteln verwendet werden.

[0249] Die genetisch veränderten Organismen weisen im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden auf.

[0250] Unter einem erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden wird in der Regel ein erhöhter Gehalt an Gesamt-Ketocarotinoid verstanden.

[0251] Unter einem erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden wird aber auch insbesondere ein veränderter Gehalt der bevorzugten Ketocarotinoide verstanden, ohne dass zwangsläufig der Gesamt-Carotinoidgehalt erhöht sein muss.

[0252] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weisen die erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Astaxanthin auf.

[0253] Unter einem erhöhten Gehalt wird in diesem Fall auch ein verursachter Gehalt an Ketocarotinoiden, bzw. Astaxanthin verstanden.

[0254] Die Erfindung betrifft ferner die neuen Ketolasen sowie die neuen Nukleinsäuren, die diese kodieren.

[0255] Insbesondere betrifft die Erfindung Ketolasen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 8 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70%, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 8 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 4 nicht enthalten ist. Die Sequenz SEQ ID NO: 4 ist, wie vorstehend erwähnt, als putatives Protein in Datenbanken annotiert.

[0256] Ferner betrifft die Erfindung Ketolasen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 6 aufweist. Die Sequenz SEQ ID NO: 6 ist, wie vorstehend erwähnt, in Datenbanken nicht annotiert.

[0257] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Ketolasen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 12 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70%, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 12 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 6 nicht enthalten ist.

[0258] Ferner betrifft die Erfindung Ketolasen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 49 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 60%, besonders bevorzugt mindestens 70%, bevorzugter mindestens 80%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 49 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 47 nicht enthalten ist. Die Sequenz SEQ ID NO: 47 ist, wie vorstehend erwähnt, als putatives Protein in Datenbanken annotiert.

[0259] Die Erfindung betrifft ferner Nukleinsäuren, kodierend ein vorstehend beschriebenes Protein, mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure nicht die Sequenz SEQ ID NO: 5 enthält.

[0260] Überraschenderweise wurde gefunden, dass ein Protein enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70%, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 4 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, eine Eigenschaft als Ketolase aufweist.

[0261] Die Erfindung betrifft daher auch die Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz

SEQ. ID. NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70%, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 4 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.

[0262] Ferner wurde überraschenderweise gefunden, dass ein Protein enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 65%, vorzugsweise mindestens 70%, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 6 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, eine Eigenschaft als Ketolase aufweist.

[0263] Die Erfindung betrifft daher auch die Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 65%, vorzugsweise mindestens 70%, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 6 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.

[0264] Ferner wurde überraschenderweise gefunden, dass ein Protein enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 47 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 60%, vorzugsweise mindestens 70%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 47 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, eine Eigenschaft als Ketolase aufweist.

[0265] Die Erfindung betrifft daher auch die Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 47 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 60%, vorzugsweise mindestens 70%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 47 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.

[0266] Im Vergleich zu den Verfahren des Standes der Technik, liefert das erfindungsgemäße Verfahren eine höhere Menge an Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin mit einer geringeren Menge an hydroxylierten Nebenprodukten.

[0267] Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Allgemeine Experimentelle Bedingungen: Sequenzanalyse rekombinanter DNA

[0268] Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463–5467).

Beispiel 1:

[0269] Amplifikation einer DNA, die die gesamte Primärsequenz der Ketolase aus *Nostoc* sp. PCC 7120 codiert

[0270] Die DNA, die für die Ketolase aus *Nostoc* PCC 7120 kodiert, wurde mittels PCR aus *Nostoc* PCC 7120 (Stamm der "Pasteur Culture Collection of Cyanobacterium") amplifiziert.

[0271] Für die Präparation von genomischer DNA aus einer Suspensionskultur von *Nostoc* PCC 7120, die 1 Woche mit Dauerlicht und konstantem Schütteln (150 rpm) at 25°C in BG 11-Medium (1.5 g/l NaNO₃, 0.04 g/l K₂PO₄ × 3H₂O, 0.075 g/l MgSO₄ × H₂O, 0.036 g/l CaCl₂ × 2H₂O, 0.006 g/l citric acid, 0.006 g/l Ferric ammonium citrate, 0.001 g/l EDTA disodium magnesium, 0.04 g/l Na₂CO₃, 1 ml trace metal mix AS+Co (2.86 g/l H₃BO₃, 1.81 g/l MnCl₂ × 4H₂O, 0.222 g/l ZnSO₄ × 7H₂O, 0.39 g/l NaMoO₄ × 2H₂O, 0.079 g/l CuSO₄ × 5H₂O, 0.0494 g/l Co(NO₃)₂ × 6H₂O) gewachsen war, wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert.

Protokoll für DNA Isolation aus *Nostoc* PCC7120:

[0272] Aus einer 10 ml Flüssigkultur wurden die Bakterienzellen durch 10minütige Zentrifugation bei 8 000 rpm pelletiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen in flüssigem Stickstoff mit einem Mörser zerstoßen und gemahlen. Das Zellmaterial wurde in 1 ml 10 mM Tris HCl (pH 7.5) resuspendiert und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß (2 ml Volumen) überführt. Nach Zugabe von 100 µl Proteinase K (Konzentration: 20 mg/ml)

wurde die Zellsuspension für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 500 µl Phenol extrahiert. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 13 000 upm wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 2 ml-Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion mit Phenol wurde 3 mal wiederholt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1110 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 0.6 Volumen Isopropanol gefällt und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in 25 µl Wasser aufgenommen und unter Erhitzung auf 65°C gelöst.

[0273] Die Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase aus *Nostoc* PCC 7120, wurde mittels "polymerase chain reaction" (PCR) aus *Nostoc* PCC 7120 unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (NOSTF, SEQ ID No. 19) und eines antisense-spezifischen Primers (NOSTG SEQ ID No. 20) amplifiziert.

[0274] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

[0275] Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl einer *Nostoc* PCC 7120 DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM NOSTF (SEQ ID No. 19)
- 0.2 mM NOSTG (SEQ ID No. 20)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 µl Aq. Dest.

[0276] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94°C 2 Minuten

35X 94°C 1 Minute

55°C 1 Minuten

72°C 3 Minuten

1X 72°C 10 Minuten

[0277] Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 19 und SEQ ID No. 20 resultierte in einem 805 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (SEQ ID No. 21). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-T (Promega) kloniert und der Klon pNOSTF-G erhalten.

[0278] Sequenzierung des Klons pNOSTF-G mit dem M13F- und dem M13R-Primer bestätigte eine Sequenz, welche mit der DNA-Sequenz des Datenbankeintrages AP003592 identisch ist. Diese Nukleotidsequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Nostoc* PCC 7120.

[0279] Dieser Klon pNOSTF-G wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1027 Bp SphI-Fragmentes aus pGEM-T und Ligierung in den SphI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die Ketolase von *Nostoc* in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJNOST.

Beispiel 2:

[0280] Konstruktion des Plasmides pMCL-CrtYIBZ/idi/gps für die Synthese von Zeaxanthin in *E. coli*. Die Konstruktion von pMCL-CrtYIBZ/idi/gps erfolgte in drei Schritten über die Zwischenstufen pMCL-CrtYIBZ und pMCL-CrtYIBZ/idi. Als Vektor wurde das mit high-copy-number Vektoren kompatible Plasmid pMCL200 verwendet (Nakano, Y., Yoshida, Y., Yamashita, Y. und Koga, T.; Construction of a series of pACYC-derived plasmid vectors; Gene 162 (1995), 157-158).

Beispiel 2.1.: Konstruktion von pMCL-CrtYIBZ

[0281] Die Biosynthesegene crtY, crtB, crtI und crtZ entstammen dem Bakterium *Erwinia uredovora* und wurden mittels PCR amplifiziert. Genomische DNA von *Erwinia uredovora* (DSM 30080) wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) innerhalb eines Service-Dienstes präpariert. Die PCR-Reaktion wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt (Roche, Long Template PCR: Procedure for amplification of 5-20 kb targets with the expand long template PCR system). Die PCR-Bedingungen für die Amplifikation des Biosynthesecusters von *Erwinia uredovora* waren die folgenden:

Master Mix 1:

- 1.75 µl dNTPs (Endkonzentration 350 µM)

- 0.3 µM Primer Crt1 (SEQ ID No. 22)
- 0.3 µM Primer Crt2 (SEQ ID No. 23)
- 250–500 ng genomische DNA von DSM 30080

[0282] Aq. Dest. bis zu einem Gesamtvolumen von 50 µl

Master Mix 2:

- 5 µl 10x PCR Puffer 1 (Endkonzentration 1x, mit 1.75 mM Mg²⁺)
- 10x PCR Puffer 2 (Endkonzentration 1x, mit 2.25 mM Mg²⁺)
- 10x PCR Puffer 3 (Endkonzentration 1x, mit 2.25 mM Mg²⁺)
- 0.75 µl Expand Long Template Enzyme Mix (Endkonzentration 2.6 Units)

[0283] Aq. Dest. bis zu einem Gesamtvolumen von 50 µl

[0284] Die beiden Ansätze "Master Mix 1" und "Master Mix 2" wurden zusammenpipetiert. Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94°C 2 Minuten

30X 94°C 30 Sekunden

58°C 1 Minute

68°C 4 Minuten

1X 72°C 10 Minuten

[0285] Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 22 und SEQ ID No. 23 resultierte in einem Fragment (SEQ ID NO: 24), das für die Gene CrtY (Protein: SEQ ID NO: 25), Crt1 (Protein: SEQ ID NO: 26), crt8 (Protein: SEQ ID NO: 27) und CrtZ (iDNA) kodiert. Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und der Klon pCR2.1-CrtYIBZ erhalten.

[0286] Das Plasmid pCR2.1-CrtYIBZ wurde Sall und HindIII geschnitten, das resultierende Sall/HindIII-Fragment isoliert und durch Ligierung in den Sall/HindIII geschnittenen Vektor pMCL200 transferiert. Das in pMCL 200 klonierte Sall/HindIII Fragment aus pCR2.1-CrtYIBZ ist 4624 Bp lang, kodiert für die Gene CrtY, Crt1, crtB und CrtZ und entspricht der Sequenz von Position 2295 bis 6918 in D90087 (SEQ ID No. 24). Der resultierende Klon heisst pMCL-CrtYIBZ.

Beispiel 2.2.: Konstruktion von pMCL-CrtYIBZ/idi

[0287] Das Gen idi (Isopentenylidiphosphat-Isomerase; IPP-Isomerase) wurde aus E. coli mittels PCR amplifiziert. Die Nukleinsäure, kodierend das gesamte idi Gen mit idi-Promotor und Ribosomenbindestelle, wurde aus E. coli mittels "polymerase chain reaction" (PCR) unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (5'-idi SEQ ID No. 28) und eines antisense-spezifischen Primers (3'-idi SEQ ID No. 29) amplifiziert.

[0288] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden: Die PCR zur Amplifikation der DNA erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl einer E. coli TOP10- Suspension
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM 5'-idi (SEQ ID No. 28)
- 0.2 mM 3'-idi (SEQ ID No. 29)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

[0289] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94°C 2 Minuten

20X 94°C 1 Minute

62°C 1 Minute

72°C 1 Minute

1X 72°C 10 Minuten

[0290] Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 28 und SEQ ID No. 29 resultierte in einem 679 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (SEQ ID No. 30). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und der Klon pCR2.1-idi erhalten.

[0291] Sequenzierung des Klons pCR2.1-idi bestätigte eine Sequenz, die sich nicht von der publizierten Sequenz AE000372 in Position 8774 bis Position 9440 unterscheidet. Diese Region umfaßt die Promotor-Region, die potentielle Ribosomenbindestelle und den gesamten "open reading frame" für die IPP-Isomerase. Das in

pCR2.1-idi klonierte Fragment hat durch das Einfügen einer XhoI-Schnittstelle am 5'-Ende und einer Sall-Schnittstelle am 3'-Ende des idi-Gens eine Gesamtlänge von 679 Bp.

[0292] Dieser Klon wurde daher für die Klonierung des idi-Gens in den Vektor pMCL-CrtYIBZ verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des XhoI/Sall-Fragmentes aus pCR2.1-idi und Ligierung in den XhoI/Sall geschnittenen Vektor pMCL-CrtYIBZ. Der resultierende Klon heisst pMCL-CrtYIBZ/idi.

Beispiel 2.3.: Konstruktion von pMCL-CrtYIBZ/idi/gps

[0293] Das Gen gps (Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase; GGPP-Synthase) wurde aus *Archaeoglobus fulgidus* mittels PCR amplifiziert. Die Nukleinsäure, kodierend gps aus *Archaeoglobus fulgidus*, wurde mittels "polymerase chain reaction" (PCR) unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (5'-gps SEQ ID No. 32) und eines antisense-spezifischen Primers (3'-gps SEQ ID No. 33) amplifiziert.

[0294] Die DNA von *Archaeoglobus fulgidus* wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) innerhalb eines Service-Dienstes präpariert. Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

[0295] Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein GGPP-Synthase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl einer *Archaeoglobus fulgidus*-DNA
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM 5'-gps (SEQ ID No. 32)
- 0.2 mM 3'-gps (SEQ ID No. 33)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

[0296] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94°C 2 Minuten

20X 94°C 1 Minute

56°C 1 Minute

72°C 1 Minute

1X 72°C 10 Minuten

[0297] Das mittels PCR und den Primern SEQ ID No. 32 und SEQ ID No. 33 amplifizierte DNA-Fragment wurde mit an sich bekannten Methoden aus dem Agarosegel eluiert und mit den Restriktionsenzymen NcoI und HindIII geschnitten. Daraus resultiert ein 962 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (SEQ ID No. 34). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das NcoI/HindIII geschnittene Amplifikat in den Vektor pCB97-30 kloniert und der Klon pCB-gps erhalten.

[0298] Sequenzierung des Klons pCB-gps bestätigte eine Sequenz für die GGPP-Synthase aus *A. fulgidus*, die sich von der publizierten Sequenz AF120272 in einem Nukleotid unterscheidet. Durch das Einfügen einer NcoI-Schnittstelle im gps-Gen wurde das zweite Kodon der GGPP-Synthase verändert. In der publizierten Sequenz AF120272 kodiert CTG (Position 4-6) für Leucin. Durch die Amplifikation mit den beiden Primern SEQ ID No. 32 und SEQ ID No. 33 wurde dieses zweite Kodon in GTG verändert, welches für Valin kodiert.

[0299] Der Klon pCB-gps wurde daher für die Klonierung des gps-Gens in den Vektor pMCL-CrtYIBZ/idi verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des KpnI/XhoI-Fragmentes aus pCB-gps und Ligierung in den KpnI und XhoI geschnittenen Vektor pMCL-CrtYIBZ/idi. Das klonierte KpnI/XhoI-Fragment (SEQ ID No. 34) trägt den Prn16-Promotor zusammen mit einer minimalen 5'-UTR-Sequenz von rbcL, den ersten 6 Kodons von rbcL, die die GGPP-Synthase N-terminal verlängern, und 3' vom gps-Gen die psbA-Sequenz. Der N-Terminus der GGPP-Synthase hat somit anstelle der natürlichen Aminosäure-Abfolge mit Met-Leu-Lys-Glu (Aminosäure 1 bis 4 aus AF120272) die veränderte Aminosäure-Abfolge Met-Thr-Pro-Gln-Thr-Ala-Mei-Val-Lys-Glu. Daraus resultiert, dass die rekombinante GGPP-Synthase, beginnend mit Lys in Position 3 (in AF120272) identisch ist und keine weiteren Änderungen in der Aminosäuresequenz aufweist. Die rbcL- und psbA-Sequenzen wurden gemäß einer Referenz nach Eibl et al. (Plant J. 19. (1999), 1-13) verwendet. Der resultierende Klon heisst pMCL-CrtYIBZ/idi/gps.

Beispiel 3:

Biotransformation von Zeaxanthin in rekombinanten *E. coli*-Stämmen

[0300] Zur Zeaxanthin-Biotransformation wurden rekombinante *E. coli*-Stämme hergestellt, welche durch heterologe Komplementation zur Zeaxanthin-Produktion befähigt sind. Stämme von *E. coli* TOP10 wurden als Wirtszellen für die Komplementations-Experimente mit den Plasmiden pNOSTF-G und pMCL-CrtYIBZ/idi/gps

verwendet.

[0301] Um *E. coli*-Stämme herzustellen, die die Synthese von Zeaxanthin in hoher Konzentration ermöglichen, wurde das Plasmid pMCL-CrtYIBZ/idi/gps konstruiert. Das Plasmid trägt die Bioynthesegene crtY, crt8, crtI und crtY von *Erwinia uredovora*, das Gen gps (für Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase) aus *Archaeoglobus fulgidus* und das Gen idi (Isopentenylidiphosphat-Isomerase) aus *E. coli*. Mit diesem Konstrukt wurden limitierende Schritte für eine hohe Akkumulation von Carotinoiden und deren biosynthetischen Vorstufen beseitigt. Dies wurde zuvor von Wang et al. in ähnlicher Weise mit mehreren Plasmiden beschrieben (Wang, C.-W., Oh, M.-K. und Liao, J.C.; Engineered isoprenoid pathway enhances astaxanthin production in *Escherichia coli*, *Biotechnology and Bioengineering* 62 (1999), 235–241).

[0302] Kulturen von *E. coli* TOP10 wurden in an sich bekannter Weise mit den beiden Plasmiden pNOSTF-G und pMCL-CrtYIBZ/idi/gps transformiert und in LB-Medium bei 30°C bzw. 37°C über Nacht kultiviert. Ampicillin (50 µg/ml), Chloramphenicol (50 µg/ml) und Isopiopyl-β-thiogalactosid (1 mmol) wurden in an sich üblicher Weise ebenfalls über Nacht zugegeben.

[0303] Zur Isolierung der Carotinoide aus den rekombinanten Stämmen wurden die Zellen mit Aceton extrahiert, das organische Lösungsmittel zur Trockne eingedampft und die Carotinoide mittels HPLC über eine C30-Säule aufgetrennt. Folgende Verfahrensbedingungen wurden eingestellt.

[0304] Trennsäule: ProntoSäule, 250 × 4,6 mm, (Bischoff, Leonberg)

Flussrate: 1.0 ml/min

Eluenten: Laufmittel A – 100% Methanol

Laufmittel B – 80% Methanol, 0.2% Ammoniumacetat

Laufmittel C – 100% t-Butyl-methylether

Gradientprofil:

Zeit	Flussrate	% Laufmittel A	% Laufmittel B	% Laufmittel C
1.00	1.0	95.0	5.0	0
1.05	1.0	80.0	5.0	15.0
14.00	1.0	42.0	5.0	53.0
14.05	1.0	95.0	5.0	0
17.00	1.0	95.0	5.0	0
18.00	1.0	95.0	5.0	0

Detektion: 300–500 nm

[0305] Die Spektren wurden direkt aus den Elutionspeaks unter Verwendung eines Photodiodenarraydetektors bestimmt. Die isolierten Substanzen wurden über ihre Absorptionsspektren und ihre Retentionszeiten im Vergleich zu Standardproben identifiziert.

[0306] **Abb. 1** zeigt die chromatographische Analyse einer Probe erhalten aus einem mit pNOSTF-G und pMCL-CrtYIBZ/idi/gps transformierten *E. coli*-Stamm. Es zeigt sich, daß dieser Stamm aufgrund der heterologen Komplementation verschiedene Ketocarotinoide synthetisieren kann. Mit zunehmender Retentionszeit werden Astaxanthin (Peak 1), Adonirubin (Peak 2) und Canthaxanthin (Peak 3) eluiert.

Beispiel 3.1

Vergleichsbeispiel

[0307] Analog zu den vorhergehenden Beispielen wurde als Vergleichsbeispiel ein *E. coli*-Stamm hergestellt, der eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille exprimiert. Dazu wurde die cDNA die für die gesamte Primärsequenz der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille codiert amplifiziert und gemäß Beispiel 1 in den gleichen Expressionsvektor kloniert.

[0308] Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* codiert, wurde mittels PCR aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") Suspensionskultur amplifiziert. Für die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur von *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80), die 2 Wochen mit indirektem Tageslicht bei Raumtemperatur in *Haematococcus*-Medium (1.2 g/l Natriumacetat, 2 g/l Hefeextrakt, 0.2 g/l MgCl₂ × 6H₂O, 0.02 CaCl₂ × 2H₂O; pH 6.8; nach Autoklavieren Zugabe von 400 mg/l L-Asparagin, 10 mg/l FeSO₄ × H₂O) gewachsen war, wurden die Zellen geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert. Anschließend wurden 100 mg der gefrorenen, pul-

verisierten Algenzellen in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0.8 ml Trizol-Puffer (LifeTechnologies) aufgenommen. Die Suspension wurde mit 0.2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12 000 g wurde der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

[0309] Für die cDNA-Synthese wurden 2.5 µg Gesamt-RNA für 10 min bei 60_C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers PR1 (gcaagctcga cagctacaaa cc) in cDNA umgeschrieben.

[0310] Die Nukleinsäure codierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers PR2 (gaagcatgca gctagcagcg acag) und eines antisense spezifischen Primers PR1 amplifiziert.

[0311] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

[0312] Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz codiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 4 µl einer *Haematococcus pluvialis* cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR1
- 0.2 mM PR2
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 µl Aq. Dest.

[0313] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94_C 2 Minuten

35X 94_C 1 Minute

53 C_2 Minuten

72 C_3 Minuten

1X 72_C 10 Minuten

[0314] Die PCR-Amplifikation mit PR1 und PR2 resultierte in einem 1155 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz codiert:

gaagcatgca	gctagcagcg	acagtaatgt	tggagcagct	taccggaagc	gctgaggcac	60
tcaaggagaa	ggagaaggag	gttgcaggca	gctctgacgt	gttgcgtaca	tgggcgaccc	120
agtactcgct	tccgtcacag	gagtcagacg	cggcccgccc	gggactgaag	aatgcctaca	180
agccaccacc	ttccgacaca	aaggcatca	caatggcgct	agctgtcatc	ggctcctggg	240
ccgcagtgtt	cctccacgcc	atttttcaaa	tcaagcttcc	gacctccttg	gaccagctgc	300
actggctgcc	cgtgtcagat	gccacagctc	agctggttag	cggcagcagc	agcctgctgc	360
acatcgctgt	agtattcttt	gtcctggagt	tcctgtacac	aggccttttt	atcaccacgc	420
atgatgctat	gcatggcacc	atcgccatga	gaaacaggca	gcttaatgac	ttcttgggca	480
gagtatgcat	ctcctgttac	gcctggtttg	attacaacat	gctgcaccgc	aagcattggg	540
agcaccacaa	ccacactggc	gaggtgggca	aggacctga	cttccacagg	ggaaaccctg	600
gcattgtgcc	ctggtttgcc	agcttcatgt	ccagctacat	gtcgaatgtg	cagtttgccg	660
gcctcgcatg	gtggacgggt	gtcatgcagc	tgtgtgggtg	gccaatggcg	aacctgctgg	720
tgttcatggc	ggccgcgccc	atcctgtccg	ccttccgctt	gttctacttt	ggcacgtaca	780
tgccccacaa	gcctgagcct	ggcgccgcgt	caggctcttc	accagccgtc	atgaactggt	840
ggaagtcgcg	cactagccag	gcgtccgacc	tggtcagctt	tctgacctgc	taccacttcg	900
acctgcactg	ggagcaccac	cgctggccct	ttgccccctg	gtgggagctg	cccaactgcc	960

gccgcctgtc	tggccgaggt	ctggttcctg	cctagctgga	cacactgcag	tgggcctgtc	1020
tgccagctgg	gcatgcaggt	tgtggcagga	ctgggtgagg	tgaaaagctg	caggcgctgc	1080
tgccggacac	gctgcatggg	ctaccctgtg	tagctgccgc	cactagggga	gggggtttgt	1140
agctgtcgag	cttgc					

[0315] Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert und der Klon pGKET02 erhalten.

[0316] Sequenzierung des Klons pGKET02 mü dem T7- und dem SP6-Primer bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in den drei Codons 73, 114 und 119 in je einer Base von der publizierten Sequenz X86782 unterscheidet. Diese Nukleotidaustausche wurden in einem unabhängigem Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Haematococcus pluvialis* Stamm 192.80.

[0317] Dieser Klon wurde für die Klonierung in den unter Beispiel 1 beschriebenen Expressionsvektor ver-

wendet. Die Klonierung erfolgte analog wie in Beispiel 1 beschrieben. Die Transformation der E.coli Stämme, deren Kultivierung und die Analyse des Carotinoidprofils erfolgte wie in Beispiel 3 beschrieben.

[0318] **Abb. 2** zeigt die chromatographische Analyse einer Probe erhalten aus einem mit diesem Expressionsvektor und pMCL-CrtYIBZ/idiIgps transformierten E. coli-Stamm. Unter Verwendung einer Ketolase aus *Haematococcus pluvialis*, wie beispielsweise in EP 725137 beschrieben, eluieren mit zunehmender Retentionszeit Astaxanthin (Peak 1), Adonixanthin (Peak 2) und nicht umgesetztes Zeaxanthin (Peak 3). Dieses Carotinoidprofil wurde bereits in EP 0725137 beschrieben.

[0319] Tabelle 1 zeigt einen Vergleich der bakteriell produzierten Carotinoidmengen:

[0320] Tabelle 1: Vergleich der bakteriellen Ketocarotinoid-Synthese bei Verwendung zweier verschiedener Ketolasen, der erfindungsgemäßen Ketolase aus *Nostoc* sp. Strain PCC7120 (Beispiel 3) und der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* als Vergleichsbeispiel (Beispiel 3.1). Carotinoidmengen sind in ng/ml Kulturflüssigkeit angegeben.

Ketolase aus	Astaxanthin	Adonirubin	Adonixanthin	Canthaxanthin	Zeaxanthin
<i>Haematococcus pluvialis</i> <i>Flotow em. Wille</i> (Vergleichsbeispiel)	13		102		738
<i>Nostoc</i> sp. Strain <i>PCC7120</i>	491	186		120	

[0321] Die erfindungsgemäße Expression der Ketolase aus *Nostoc* sp. Strain PCC7120 führt zu einem Carotinoidmuster, welches sich von dem Carotinoidmuster nach Expression einer Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* deutlich unterscheidet. Während die Ketolase aus dem Stand der Technik nur sehr unvollständig das gewünschte Ketocarotinoid Astaxanthin liefert, ist Astaxanthin bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Ketolase das Hauptprodukt. Im erfindungsgemäßen Verfahren treten hydroxylierte Nebenprodukte in einer deutlich geringeren Menge auf.

Beispiel 4:

[0322] Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der *Nostoc* sp. PCC 7120 Ketolase in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

[0323] Die Expression der Ketolase aus *Nostoc* in *L. esculentum* und in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters FNR (Ferredoxin NADPH Oxidoreductase) aus *Arabidopsis thaliana*. Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240: 709–715).

[0324] Das DNA Fragment, das die FNR Promotorregion –635 bis –1 aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer FNR-1 (SEQ ID No.38) und FNR-2 (SEQ ID No. 39) hergestellt.

[0325] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

[0326] Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das FNR-Promotortragment FNR1-2 (–635 bis –1) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 100 ng genomischer DNA aus *A. thaliana*
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM FNR-1 (SEQ ID No. 38)
- 0.2 mM FNR-2 (SEQ ID No. 39)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

[0327] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94°C 2 Minuten

35X 94°C 1 Minute

50°C 1 Minute

72°C 1 Minute

1X 72°C 10 Minuten

[0328] Das 653 bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pFNR erhalten.

[0329] Sequenzierung des Klons pFNR bestätigte eine Sequenz, die mit einem Sequenzabschnitt auf Chromosom 5 von *Arabidopsis thaliana* (Datenbankeintrag AB011474) von Position 70127 bis 69493 überein-

stimmt. Das Gen beginnt bei Basenpaar 69492 und ist mit "Ferredoxin-NADP+ Reductase" annotiert.

[0330] Dieser Klon heisst pFNR und wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerneau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

[0331] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 635 by SacI-HindIII Fragmentes aus pFNR und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter FNR anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJITFNR.

[0332] Zur Herstellung einer Expressionskassette pJFNRNOST wurde das 805 by SphI-Fragment NOSTF-G (in Beispiel 1 beschrieben) in den SphI geschnittenen Vektor pJITFNR kloniert. Der Klon, der das Fragment NOSTF-G in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJFNRNOST.

[0333] Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium vermittelte Transformation der Ketolase aus Nostoc in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

[0334] Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3FNRNOST wurde das 2.4 Kb SacI-XhoI Fragment (partielle SacI Hydrolyse) aus pJFNRNOST mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (**Abb. 3**, Konstruktkarte). In der **Abb. 3** beinhaltet Fragment FNR-Promotor den FNR Promotor (655 bp), Fragment rbcS TransitPeptid das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment Nost Ketolase (799 bp) die gesamte Primärsequenz, kodierend für die Nostoc Ketolase, Fragment 35S Terminator (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

[0335] Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium-vermittelte Transformation des Expressionsvektor mit der Ketolase aus Nostoc in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

[0336] Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors pSSFNRNOST wurde das 2.4 Kb SacI-XhoI Fragment (partielle SacI Hydrolyse) aus pJFNRNOST mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUNS ligiert (**Abb. 4**, Konstruktkarte). In der **Abb. 4** beinhaltet Fragment FNR Promotor den duplizierten FNR Promotor (655 bp), Fragment rbcS Transit Peptid das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment Nost Ketolase (799 bp) die gesamte Primärsequenz, kodierend für die Nostoc Ketolase, Fragment 35S Terminator (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Beispiel 5:

Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der Nostoc sp. PCC 7120 Ketolase in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

[0337] Die Expression der Ketolase aus Nostoc in *L. esculentum* und *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240: 709–715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298–10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711–1721).

[0338] Das DNA Fragment, das die AP3 Promoterregion –902 bis +15 aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer AP3-1 (SEQ ID No. 41) und AP3-2 (SEQ ID No. 42) hergestellt.

[0339] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

[0340] Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (–902 bis +15) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM AP3-1 (SEQ ID No. 41)
- 0.2 mM AP3-2 (SEQ ID No. 42)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

[0341] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94°C 2 Minuten

35X 94°C 1 Minute

50°C 1 Minute

72°C 1 Minute

1X 72°C 10 Minuten

[0342] Das 929 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pAP3 erhalten.

[0343] Sequenzierung des Klons pAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein

G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298-10200) unterscheidet. Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die tatsächliche Nukleotidsequenz in den verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen.

[0344] Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pAP3 hergestellt. Die Region 10200-9771 wurde mit den Primern AP3-1 (SEQ ID No. 41) und Primer AP3-4 (SEQ ID No. 44) amplifiziert (Amplifikat A1/4), die Region 9526-9285 wurde mit den AP3-3 (SEQ ID No. 43) und AP3-2 (SEQ ID No. 42) amplifiziert (Amplifikat A2/3).

[0345] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

[0346] Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die die Regionen Region 10200-9771 und Region 9526-9285 des AP3 Promoters beinhalten, erfolgte in 50 µl Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM sense Primer (AP3-1 SEQ ID No. 41 bzw. AP3-3 SEQ ID No. 43)
- 0.2 mM antisense Primer (AP3-4 SEQ ID No. 44 bzw. AP3-2 SEQ ID No. 42)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

[0347] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94°C 2 Minuten

35X 94°C 1 Minute

50°C 1 Minute

72°C 1 Minute

1X 72°C 10 Minuten

[0348] Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A1/4 und A2/3, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670-9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) beider Amplifikate A1/4 und A2/3 erfolgte in einem 17.6 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 0.5 µg A1/4 Amplifikat
- 0.25 µg A2/3 Amplifikat

[0349] Das Auffüllen der 3'-Enden (30 min bei 30°C) erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 17.6 µl A1/4 und A2/3-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 µM dNTPs
- 2 µl 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

[0350] Die Nukleinsäure kodierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (AP3-1 SEQ ID No. 41) und eines antisense spezifischen Primers (AP3-2 SEQ ID No. 42) amplifiziert.

[0351] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

[0352] Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM AP3-1 (SEQ ID No. 41)
- 0.2 mM AP3-2 (SEQ ID No. 42)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

[0353] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94°C 2 Minuten

35X 94°C 1 Minute

50°C 1 Minute

72°C 1 Minute

1X 72°C 10 Minuten

[0354] Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 41 (AP3-1) und SEQ ID No. 42 (AP3-2) resultierte in einem 783 Bp Fragment, das für die modifizierte Promoterversion AP3P kodiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pAP3P erhalten. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200-9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285-9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

[0355] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 783 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJITAP3P. Zur Herstellung einer Expressionskassette pJAP3NOST wurde das 805 Bp SpHI-Fragment NOSTF-G (in Beispiel 1 beschrieben) in den SpHI geschnittenen Vektor pJITAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment NOSTF-G in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJAP3NOST.

[0356] Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P-kontrollierten Ketolase aus Nostoc in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02100900).

[0357] Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3AP3NOST wurde das 2.6 KB bp SacI-XhoI Fragment (partielle SacI Hydrolyse) aus pJAP3NOST mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (**Abb. 5**, Konstruktkarte). In der **Abb. 5** beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (783 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (207 bp), Fragment NOSTF-G (792 bp) die gesamte Primärsequenz kodierend für die Nostoc Ketolase, Fragment term (795 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

[0358] Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P-kontrollierten Ketolase aus Nostoc in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

[0359] Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AP3NOST wurde das 2.6 KB bp SacI-XhoI (partielle SacI Hydrolyse) Fragment aus pS5AP3NOST mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (**Abb. 6**, Konstruktkarte). In der **Abb. 6** beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (783 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (207 bp), Fragment NOSTF-G (792 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die Nostoc Ketolase, Fragment term (795 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Beispiel 6:

Herstellung transgener *Lycopersicon esculentum* Pflanzen

[0360] Transformation und Regeneration von Tomatenpflanzen erfolgte nach der publizierten Methode von Ling und Mitarbeitern (Plant Cell Reports (1998), 17: 843–847). Für die Varietät Microtom wurde mit höherer Kanamycin-Konzentration (100 mg/L) selektioniert.

[0361] Als Ausgangsexplantat für die Transformation dienten Kotyledonen und Hypokotyle sieben bis zehn Tage alter Keimlinge der Linie Microtom. Für die Keimung wurde das Kulturmedium nach Murashige und Skoog (1962: Murashige and Skoog, 1962, Physiol. Plant 15, 473-) mit 2% Saccharose, pH 6, 1 verwendet. Die Keimung fand bei 21°C bei wenig Licht (20–100 µE) statt. Nach sieben bis zehn Tagen wurden die Kotyledonen quer geteilt und die Hypokotyle in ca. 5–10 mm lange Abschnitte geschnitten und auf das Medium MSBN (MS, pH 6,1, 3% Saccharose + 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l NAA) gelegt, das am Vortag mit suspensionskultivierten Tomatenzellen beschickt wurde. Die Tomatenzellen wurden luftblasenfrei mit sterilem Filterpapier abgedeckt. Die Vorkultur der Explantate auf dem beschriebenen Medium erfolgte für drei bis fünf Tage. Zellen des Stammes Agrobacterium tumefaciens LBA4404 wurden einzeln mit den Plasmiden pS3FNRNOST und pS3AP3NOST transformiert. Von den einzelnen mit den Binärvektoren pS3FNRNOST und pS3AP3NOST transformierten Agrobacterium-Stämmen wurde jeweils eine Übernachtskultur in YEB Medium mit Kanamycin (20 mg/l) bei 28°C kultiviert und die Zellen zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde mit flüssigem MS Medium (3% Saccharose, pH 6,1) resuspendiert und auf eine optische Dichte von 0,3 (bei 600 nm) eingestellt. Die vorkultivierten Explantate wurden in die Suspension überführt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Explantate mit sterilem Filterpapier getrocknet und für die dreitägige Co-Kultur (21°C) auf ihr Vorkulturmedium zurück gelegt.

[0362] Nach der Co-kultur wurden die Explantate auf MSZ2 Medium (MS pH 6,1 + 3% Saccharose, 2 mg/l Zeatin, 100 mg/l Kanamycin, 160 mg/l Timentin) transferiert und für die selektive Regeneration bei 21°C unter Schwachlicht Bedingungen (20–100 µE, Lichtrythmus 16h/8h) aufbewahrt. Alle zwei bis drei Wochen erfolgte der Transfer der Explantate bis sich Sprosse bilden. Kleine Sprosse konnten vom Explantat abgetrennt werden und auf MS (pH 6,1 + 3% Saccharose) 160 mg/l Timentin, 30 mg/l Kanamycin, 0,1 mg/l IAA bewurzelt werden. Bewurzelte Pflanzen wurden ins Gewächshaus überführt.

[0363] Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Expressionskonst-

rukten folgende Linien erhalten:

Mit pS3FNRNOST wurde erhalten: ms 101-1, ms101-2, ms101-3

Mit pS3AP3NOST wurde erhalten: ms 102-1, ms102-2, ms102-3

Beispiel 7:

Herstellung transgener Tagetes Pflanzen

[0364] Tagetessamen werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and Skoog, *Physiol. Plant.* 15 (1962), 473–497) pH 5,8, 2% Saccharose) aufgelegt. Die Keimung erfolgt in einem Temperatur/Lichtzeitintervall von 18–28°C/20–200 µE/3–16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21°C, 20–70 µE, für 4–8 Wochen.

[0365] Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten in vitro Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10–60 mm² werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS – Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

[0366] Ein beliebiger Agrobakterium tumefaciens Stamm, bevorzugt aber ein supervirulenter Stamm, wie z.B. EHA105 mit einem entsprechenden Binärplasmid, das ein Selektionsmarkergen (bevorzugt bar oder pat) sowie ein oder mehrere Trait- oder Reportergene tragen kann wird (pS5FNRNOST und pS5AP3NOST), über Nacht angezogen und für die Co-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet. Die Anzucht des Bakterienstammes kann wie folgt erfolgen: Eine Einzelkolonie des entsprechenden Stammes wird in YEB (0,1% Hefeextrakt, 0,5% Rindfleischextrakt, 0,5% Pepton, 0,5% Saccharose, 0,5% Magnesiumsulfat × 7 H₂O) mit 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28°C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wird die Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min geerntet und derart in flüssigem MS Medium resuspendiert, daß eine OD₆₀₀ von ca. 0,1 bis 0,8 entstand. Diese Suspension wird fuer die C-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet.

[0367] Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakteriensuspension erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8% Plant Agar (Duchefa, NL) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolylessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30–80 µMol/m² × sec, Temperatur: 22–24°C, helldunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timentin in einer Konzentration von 200 bis 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar.

[0368] Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sproßknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 0,5 mg/l Gibberillinsäure GA₃, zur Bewurzelung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.

[0369] Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:

[0370] Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3–4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert werden. Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration wie oben beschrieben.

[0371] Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden. Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.

[0372] Die Zugabe von AgNO₃ (3–10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.

[0373] Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.

[0374] Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.

[0375] Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien erhalten:

[0376] Mit pSSFNRNOST wurde beispielsweise erhalten: ms 103-1, ms103-2, ms103-3, mit pS5AP3NOST wurde beispielsweise erhalten: ms 104-1, ms104-2, ms104-3

Beispiel 9

Charakterisierung der transgenen Pflanzenblüten

Beispiel 9.1

Trennung von Carotinoidestern in Blütenblättern transgener Pflanzen

Allgemeine Arbeitsvorschrift:

[0377] Die Blütenblätter der transgenen Pflanzen werden in flüssigem Stickstoff gemörsert und das Petalenpulver (etwa 40 mg) mit 100% Aceton extrahiert (dreimal je 500 µl). Das Lösungsmittel wird evaporiert und die Carotinoide in 100–200 µl Petrolether/Aceton (5:1, v/v) resuspendiert.

[0378] Die Carotinoide werden in konzentrierter Form mittels Dünnschicht-Chromatographie (TLC) auf Silica60 F254-Platten (Merck) in einem organischen Laufmittel (Petrolether/Aceton; 5:1) entsprechend ihrer Phobizität aufgetrennt. Gelbe (Xanthophyllester), rote (Ketocarotinoidester) und orange Banden (Mischung aus Xanthophyll- und Ketocarotinoidestern) auf der TLC werden ausgekratzt.

[0379] Die an Silica gebundenen Carotinoide werden dreimal mit 500 µl Aceton eluiert, das Lösungsmittel evaporiert und die Carotinoide mittels HPLC aufgetrennt und identifiziert.

[0380] Mittels einer C30-reverse phase-Säule kann zwischen Mono- und Diestern der Carotinoide unterschieden werden. HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al. (2000), Plant Journal 24 (4): 551–558). Folgende Verfahrensbedingungen wurden eingestellt.

[0381] Trennsäule: Prontosil C30-Säule, 250 × 4,6 mm, (Bischoff, Leonberg)

Flussrate: 1.0 ml/min

Eluenten: Laufmittel A – 100% Methanol

Laufmittel B – 80% Methanol, 0.2% Ammoniumacetat

Laufmittel C – 100% t-Butyl-methylether

Gradientprofil:

Zeit	Flussrate	% Laufmittel A	% Laufmittel B	% Laufmittel C
12.0	1.0	95.0	5.0	0
12.1	1.0	80.0	5.0	15.0
22.0	1.0	76.0	5.0	19.0
22.0	1.0	66.5	5.0	28.5
38.0	1.0	15.0	5.0	80.0
45.0	1.0	95.0	5.0	0
46.0	1.0	95.0	5.0	0
46.1	1.0	95.0	5.0	0

Detektion: 300–500 nm

[0382] Eine Identifizierung der Carotinoide ist aufgrund der UV-VIS-Spektren möglich.

[0383] Petalenmaterial der transgenen Tomatenpflanzen wird gemörsert und mit Aceton extrahiert. Extrahierte Carotinoide werden mittels TLC aufgetrennt. In den Linien können Mono- und Diester von Ketocarotinoiden detektiert werden; die Monoester sind in deutlich geringerer Konzentration als die Diester vorhanden.

Beispiel 10

Enzymatische Hydrolyse von Carotinoidestern und Identifizierung der Carotinoide Allgemeine Arbeitsvorschrift

[0384] Gemörsertes Petalenmaterial (30–100 mg Frischgewicht) wird mit 100% Aceton (dreimal 500 µl; jeweils etwa 15 Minuten schütteln) extrahiert. Das Lösungsmittel wird evaporiert. Carotinoide werden anschließend in 495 µl Aceton aufgenommen, 4,95 ml Kalium-phosphatpuffer (100 mM, pH 7.4) zugegeben und gut gemischt. Danach erfolgt die Zugabe von ca. 17 mg Bile-Salze (Sigma) und 149 µl einer NaCl/CaCl₂-Lösung (3M NaCl und 75 mM CaCl₂). Die Suspension wird für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Für die enzymatische

Hydrolyse der Carotinoidester wird 595 µl einer Lipaselösung (50 mg/ml Lipase Typ7 von *Candida rugosa*(Sigma)) zugegeben und unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach etwa 21 Stunden erfolgte nochmals eine Zugabe von 595 µl Lipase mit erneuter Inkubation von mindestens 5 Stunden bei 37°C. Anschließend werden etwa ca. 700 mg $\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10\text{H}_2\text{O}$ in der Lösung gelöst. Nach Zugabe von 1800 µl Petrolether werden die Carotinoide durch kräftig Mischen in die organische Phase extrahiert. Dieses Ausschütteln wird solange wiederholt, bis die organische Phase farblos bleibt. Die Petroletherfraktionen werden vereinigt und der Petrolether evaporiert. Freie Carotinoide werden in 100–120 µl Aceton aufgenommen. Mittels HPLC und C30-reverse phase-Säule können freie Carotinoide aufgrund von Retentionszeit und UV-VIS-Spektren identifiziert werden.

SEQUENCE LISTING

<110> SunGene GmbH & Co. KGaA

<120> Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden in genetisch veränderten Organismen

<130> 20020636

<160> 51

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 777

<212> DNA

<213> Nostoc sp. Strain PCC7120

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(777)

<223>

<400> 1		
atg gtt cag tgt caa cca tca tct ctg cat tca gaa aaa ctg gtg tta		48
Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu		
1 5 10 15		
ttg tca tcg aca atc aga gat gat aaa aat att aat aag ggt ata ttt		96
Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe		
20 25 30		
att gcc tgc ttt atc tta ttt tta tgg gca att agt tta atc tta tta		144
Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu		
35 40 45		
ctc tca ata gat aca tcc ata att cat aag agc tta tta ggt ata gcc		192
Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala		
50 55 60		
atg ctt tgg cag acc ttc tta tat aca ggt tta ttt att act gct cat		240
Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His		
65 70 75 80		
gat gcc atg cac ggc gta gtt tat ccc aaa aat ccc aga ata aat aat		288
Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn		

85										90										95										
ttt	ata	ggt	aag	ctc	act	cta	atc	ttg	tat	gga	cta	ctc	cct	tat	aaa	336														
Phe	Ile	Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	Ile	Leu	Tyr	Gly	Leu	Leu	Pro	Tyr	Lys															
			100					105					110																	
gat	tta	ttg	aaa	aaa	cat	tgg	tta	cac	cac	gga	cat	cct	ggt	act	gat	384														
Asp	Leu	Leu	Lys	Lys	His	Trp	Leu	His	His	Gly	His	Pro	Gly	Thr	Asp															
		115					120					125																		
tta	gac	cct	gat	tat	tac	aat	ggt	cat	ccc	caa	aac	ttc	ttt	ctt	tgg	432														
Leu	Asp	Pro	Asp	Tyr	Tyr	Asn	Gly	His	Pro	Gln	Asn	Phe	Phe	Leu	Trp															
	130					135				140																				
tat	cta	cat	ttt	atg	aag	tct	tat	tgg	cga	tgg	acg	caa	att	ttc	gga	480														
Tyr	Leu	His	Phe	Met	Lys	Ser	Tyr	Trp	Arg	Trp	Thr	Gln	Ile	Phe	Gly															
145				150					155						160															
tta	gtg	atg	att	ttt	cat	gga	ctt	aaa	aat	ctg	gtg	cat	ata	cca	gaa	528														
Leu	Val	Met	Ile	Phe	His	Gly	Leu	Lys	Asn	Leu	Val	His	Ile	Pro	Glu															
			165						170					175																
aat	aat	tta	att	ata	ttt	tgg	atg	ata	cct	tct	att	tta	agt	tca	gta	576														
Asn	Asn	Leu	Ile	Ile	Phe	Trp	Met	Ile	Pro	Ser	Ile	Leu	Ser	Ser	Val															
			180					185					190																	
caa	cta	ttt	tat	ttt	ggt	aca	ttt	ttg	cct	cat	aaa	aag	cta	gaa	ggt	624														
Gln	Leu	Phe	Tyr	Phe	Gly	Thr	Phe	Leu	Pro	His	Lys	Lys	Leu	Glu	Gly															
		195					200					205																		
ggt	tat	act	aac	ccc	cat	tgt	gcg	cgc	agt	atc	cca	tta	cct	ctt	ttt	672														
Gly	Tyr	Thr	Asn	Pro	His	Cys	Ala	Arg	Ser	Ile	Pro	Leu	Pro	Leu	Phe															
	210					215					220																			
tgg	tct	ttt	gtt	act	tgt	tat	cac	ttc	ggc	tac	cac	aag	gaa	cat	cac	720														
Trp	Ser	Phe	Val	Thr	Cys	Tyr	His	Phe	Gly	Tyr	His	Lys	Glu	His	His															
225					230					235					240															
gaa	tac	cct	caa	ctt	cct	tgg	tgg	aaa	tta	cct	gaa	gct	cac	aaa	ata	768														
Glu	Tyr	Pro	Gln	Leu	Pro	Trp	Trp	Lys	Leu	Pro	Glu	Ala	His	Lys	Ile															
				245					250					255																
tct	tta	taa														777														
Ser	Leu																													

<210> 2

<211> 258

<212> PRT

<213> Nostoc sp. Strain PCC7120

<400> 2

Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe
 20 25 30

Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu

35

40

45

Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala
 50 55 60

Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His
 65 70 75 80

Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn
 85 90 95

Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys
 100 105 110

Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp
 115 120 125

Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp
 130 135 140

Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly
 145 150 155 160

Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu
 165 170 175

Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val
 180 185 190

Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly
 195 200 205

Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe
 210 215 220

Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His
 225 230 235 240

Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile
 245 250 255

Ser Leu

<210> 3

<211> 789

<212> DNA

<213> Nostoc punctiforme

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(789)

<223>

<400> 3

ttg aat ttt tgt gat aaa cca gtt agc tat tat gtt gca ata gag caa	48
Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln	
1 5 10 15	
tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg gtg att gtc ata gta	96
Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val	
20 25 30	
att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt tta cta gct att aat	144
Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn	
35 40 45	
tat gcc aaa gtc cca att tgg ttg ata cct att gca ata gtt tgg caa	192
Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln	
50 55 60	
atg ttc ctt tat aca ggg cta ttt att act gca cat gat gct atg cat	240
Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His	
65 70 75 80	
ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat aat ttt atc ggt tca	288
Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser	
85 90 95	
cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tat caa cag atg tta aag	336
Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys	
100 105 110	
aat cat tgc tta cat cat cgt cat cct gct agc gaa gtt gac cca gat	384
Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp	
115 120 125	
ttt cat gat ggt aag aga aca aac gct att ttc tgg tat ctc cat ttc	432
Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe	
130 135 140	
atg ata gaa tac tcc agt tgg caa cag tta ata gta cta act atc cta	480
Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu	
145 150 155 160	
ttt aat tta gct aaa tac gtt ttg cac atc cat caa ata aat ctc atc	528
Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile	
165 170 175	
tta ttt tgg agt att cct cca att tta agt tcc att caa ctg ttt tat	576
Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr	
180 185 190	
ttc gga aca ttt ttg cct cat cga gaa ccc aag aaa gga tat gtt tat	624
Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr	
195 200 205	
ccc cat tgc agc caa aca ata aaa ttg cca act ttt ttg tca ttt atc	672
Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile	
210 215 220	

gct tgc tac cac ttt ggt tat cat gaa gaa cat cat gag tat ccc cat 720
 Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His
 225 230 235 240

gta cct tgg tgg caa ctt cca tct gta tat aag cag aga gta ttc aac 768
 Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn
 245 250 255

aat tca gta acc aat tcg taa 789
 Asn Ser Val Thr Asn Ser
 260

<210> 4

<211> 262

<212> PRT

<213> Nostoc punctiforme

<400> 4

Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln
 1 5 10 15

Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val
 20 25 30

Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn
 35 40 45

Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln
 50 55 60

Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His
 65 70 75 80

Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser
 85 90 95

Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys
 100 105 110

Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp
 115 120 125

Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe
 130 135 140

Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu
 145 150 155 160

Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile
 165 170 175

Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr
 180 185 190

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr
 195 200 205

Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile
 210 215 220

Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His
 225 230 235 240

Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn
 245 250 255

Asn Ser Val Thr Asn Ser
 260

<210> 5

<211> 762

<212> DNA

<213> Nostoc punctiforme

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(762)

<223>

<400> 5	
gtg atc cag tta gaa caa cca ctc agt cat caa gca aaa ctg act cca	48
Met Ile Gln Leu 5 Glu Gln Pro Leu Ser 10 His Gln Ala Lys Leu 15 Thr Pro	
gta ctg aga agt aaa tct cag ttt aag ggg ctt ttc att gct att gtc	96
Val Leu Arg Ser 20 Lys Ser Gln Phe 25 Lys Gly Leu Phe Ile 30 Ala Ile Val	
att gtt agc gca tgg gtc att agc ctg agt tta tta ctt tcc ctt gac	144
Ile Val Ser 35 Ala Trp Val 40 Ser Leu Ser Leu Leu 45 Ser Leu Asp	
atc tca aag cta aaa ttt tgg atg tta ttg cct gtt ata cta tgg caa	192
Ile Ser 50 Lys Leu Lys Phe 55 Trp Met Leu Leu Pro 60 Val Ile Leu Trp Gln	
aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca tct cat gat gcc atg cat	240
Thr Phe Leu Tyr Thr 70 Gly Leu Phe Ile Thr 75 Ser His Asp Ala Met His 80	
ggc gta gta ttt ccc caa aac acc aag att aat cat ttg att gga aca	288
Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr	

85										90					95					
ttg	acc	cta	tcc	ctt	tat	ggt	ctt	tta	cca	tat	caa	aaa	cta	ttg	aaa		336			
Leu	Thr	Leu	Ser	Leu	Tyr	Gly	Leu	Leu	Pro	Tyr	Gln	Lys	Leu	Leu	Lys					
			100					105					110							
aaa	cat	tgg	tta	cac	cac	cac	aat	cca	gca	agc	tca	ata	gac	ccg	gat		384			
Lys	His	Trp	Leu	His	His	His	Asn	Pro	Ala	Ser	Ser	Ile	Asp	Pro	Asp					
		115					120					125								
ttt	cac	aat	ggt	aaa	cac	caa	agt	ttc	ttt	gct	tgg	tat	ttt	cat	ttt		432			
Phe	His	Asn	Gly	Lys	His	Gln	Ser	Phe	Phe	Ala	Trp	Tyr	Phe	His	Phe					
		130				135					140									
atg	aaa	ggt	tac	tgg	agt	tgg	ggg	caa	ata	att	gcg	ttg	act	att	att		480			
Met	Lys	Gly	Tyr	Trp	Ser	Trp	Gly	Gln	Ile	Ile	Ala	Leu	Thr	Ile	Ile					
					150					155					160					
tat	aac	ttt	gct	aaa	tac	ata	ctc	cat	atc	cca	agt	gat	aat	cta	act		528			
Tyr	Asn	Phe	Ala	Lys	Tyr	Ile	Leu	His	Ile	Pro	Ser	Asp	Asn	Leu	Thr					
				165					170					175						
tac	ttt	tgg	gtg	cta	ccc	tcg	ctt	tta	agt	tca	tta	caa	tta	ttc	tat		576			
Tyr	Phe	Trp	Val	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Gln	Leu	Phe	Tyr					
			180					185					190							
ttt	ggt	act	ttt	tta	ccc	cat	agt	gaa	cca	ata	ggg	ggt	tat	gtt	cag		624			
Phe	Gly	Thr	Phe	Leu	Pro	His	Ser	Glu	Pro	Ile	Gly	Gly	Tyr	Val	Gln					
		195					200				205									
cct	cat	tgt	gcc	caa	aca	att	agc	cgt	cct	att	tgg	tgg	tca	ttt	atc		672			
Pro	His	Cys	Ala	Gln	Thr	Ile	Ser	Arg	Pro	Ile	Trp	Trp	Ser	Phe	Ile					
		210				215					220									
acg	tgc	tat	cat	ttt	ggc	tac	cac	gag	gaa	cat	cac	gaa	tat	cct	cat		720			
Thr	Cys	Tyr	His	Phe	Gly	Tyr	His	Glu	Glu	His	His	Glu	Tyr	Pro	His					
					230					235					240					
att	tct	tgg	tgg	cag	tta	cca	gaa	att	tac	aaa	gca	aaa	tag				762			
Ile	Ser	Trp	Trp	Gln	Leu	Pro	Glu	Ile	Tyr	Lys	Ala	Lys								
				245					250											

<210> 6

<211> 253

<212> PRT

<213> Nostoc punctiforme

<400> 6

Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro
1 5 10 15

Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val
20 25 30

Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Ser Leu Asp
35 40 45

Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln

50

55

60

Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His
65 70 75 80

Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr
85 90 95

Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys
100 105 110

Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp
115 120 125

Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe
130 135 140

Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile
145 150 155 160

Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr
165 170 175

Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr
180 185 190

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln
195 200 205

Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile
210 215 220

Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His
225 230 235 240

Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys
245 250

<210> 7

<211> 789

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(789)

<223>

<400> 7	
atg aat ttt tgt gat aaa cca gtt agc tat tat gtt gca ata gag caa Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln 1 5 10 15	48
tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg gtg att gtc ata gta Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val 20 25 30	96
att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt tta cta gct att aat Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn 35 40 45	144
tat gcc aaa att cat aag tgg ttg ata cct att gca ata gtt tgg caa Tyr Ala Lys Ile His Lys Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln 50 55 60	192
atg ttc ctt tat aca ggg cta ttt att act gca cat gat gct atg cat Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His 65 70 75 80	240
ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat aat ttt atc ggt tca Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser 85 90 95	288
cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tat caa cag atg tta aag Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys 100 105 110	336
aat cat tgc tta cat cat cgt cat cct gct agc gaa gtt gac cca gat Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp 115 120 125	384
ttt cat gat ggt aag aga aca aac gct att ttc tgg tat ctc cat ttc Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe 130 135 140	432
atg ata gaa tac tcc agt tgg caa cag tta ata gta cta act atc cta Met Ile Glu Tyr Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu 145 150 155 160	480
ttt aat tta gct aaa tac gtt ttg cac atc cat caa ata aat ctc atc Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile 165 170 175	528
tta ttt tgg agt att cct cca att tta agt tcc att caa ctg ttt tat Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr 180 185 190	576
ttc gga aca ttt ttg cct cat cga gaa ccc aag aaa gga tat gtt tat Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr 195 200 205	624
ccc cat tgc agc caa aca ata aaa ttg cca act ttt ttg tca ttt atc Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile 210 215 220	672
gct tgc tac cac ttt ggt tat cat gaa gaa cat cat gag tat ccc cat Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His 225 230 235 240	720
gta cct tgg tgg caa ctt cca tct gta tat aag cag aga gta ttc aac Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn 245 250 255	768

aat tca gta acc aat tcg taa
 Asn Ser Val Thr Asn Ser
 260

789

<210> 8

<211> 262

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<400> 8

Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln
 1 5 10 15

Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val
 20 25 30

Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn
 35 40 45

Tyr Ala Lys Ile His Lys Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln
 50 55 60

Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His
 65 70 75 80

Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser
 85 90 95

Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys
 100 105 110

Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp
 115 120 125

Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe
 130 135 140

Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu
 145 150 155 160

Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile
 165 170 175

Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr
 180 185 190

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr
 195 200 205

Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile
 210 215 220

Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His
 225 230 235 240

Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn
 245 250 255

Asn Ser Val Thr Asn Ser
 260

<210> 9

<211> 789

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(789)

<223>

<400> 9

atg aat ttt tgt gat aaa cca gtt agc tat tat gtt gca ata gag caa 48
 Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln
 1 5 10 15

tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg gtg att gtc ata gta 96
 Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val
 20 25 30

att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt tta cta gct att aat 144
 Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn
 35 40 45

tat gcc aaa gtc cca att tgg ttg ata cct att gca ata gtt tgg caa 192
 Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln
 50 55 60

atg ttc ctt tat aca ggg cta ttt att act gca cat gat gct atg cat 240
 Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His
 65 70 75 80

ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat aat ttt atc ggt tca 288
 Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser
 85 90 95

cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tat caa cag atg tta aag 336
 Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys
 100 105 110

aat cat tgc tta cat cat cgt cat cct gct agc gat tta gac cca gat 384
 Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Asp Leu Asp Pro Asp

115					120					125						
ttt	cat	gat	ggt	aag	aga	aca	aac	gct	att	ttc	tgg	tat	ctc	cat	ttc	432
Phe	His	Asp	Gly	Lys	Arg	Thr	Asn	Ala	Ile	Phe	Trp	Tyr	Leu	His	Phe	
	130					135					140					
atg	ata	gaa	tac	tcc	agt	tgg	caa	cag	tta	ata	gta	cta	act	atc	cta	480
Met	Ile	Glu	Tyr	Ser	Ser	Trp	Gln	Gln	Leu	Ile	Val	Leu	Thr	Ile	Leu	
145					150					155					160	
ttt	aat	tta	gct	aaa	tac	gtt	ttg	cac	atc	cat	caa	ata	aat	ctc	atc	528
Phe	Asn	Leu	Ala	Lys	Tyr	Val	Leu	His	Ile	His	Gln	Ile	Asn	Leu	Ile	
				165					170					175		
tta	ttt	tgg	agt	att	cct	cca	att	tta	agt	tcc	att	caa	ctg	ttt	tat	576
Leu	Phe	Trp	Ser	Ile	Pro	Pro	Ile	Leu	Ser	Ser	Ile	Gln	Leu	Phe	Tyr	
			180					185					190			
ttc	gga	aca	ttt	ttg	cct	cat	cga	gaa	ccc	aag	aaa	gga	tat	gtt	tat	624
Phe	Gly	Thr	Phe	Leu	Pro	His	Arg	Glu	Pro	Lys	Lys	Gly	Tyr	Val	Tyr	
	195						200					205				
ccc	cat	tgc	agc	caa	aca	ata	aaa	ttg	cca	act	ttt	ttg	tca	ttt	atc	672
Pro	His	Cys	Ser	Gln	Thr	Ile	Lys	Leu	Pro	Thr	Phe	Leu	Ser	Phe	Ile	
	210					215					220					
gct	tgc	tac	cac	ttt	ggt	tat	cat	gaa	gaa	cat	cat	gag	tat	ccc	cat	720
Ala	Cys	Tyr	His	Phe	Gly	Tyr	His	Glu	Glu	His	His	Glu	Tyr	Pro	His	
225					230					235					240	
gta	cct	tgg	tgg	caa	ctt	cca	tct	gta	tat	aag	cag	aga	gta	ttc	aac	768
Val	Pro	Trp	Trp	Gln	Leu	Pro	Ser	Val	Tyr	Lys	Gln	Arg	Val	Phe	Asn	
				245					250					255		
aat	tca	gta	acc	aat	tcg	taa										789
Asn	Ser	Val	Thr	Asn	Ser											
			260													

<210> 10

<211> 262

<212> PRT

<213> künstliche Sequenz

<400> 10

Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val
20 25 30

Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn
35 40 45

Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln
50 55 60

Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His

65				70				75				80			
Gly	Ser	Val	Tyr	Arg ₈₅	Lys	Asn	Pro	Lys	Ile ₉₀	Asn	Asn	Phe	Ile	Gly ₉₅	Ser
Leu	Ala	Val	Ala ₁₀₀	Leu	Tyr	Ala	Val	Phe ₁₀₅	Pro	Tyr	Gln	Gln	Met ₁₁₀	Leu	Lys
Asn	His	Cys ₁₁₅	Leu	His	His	Arg	His ₁₂₀	Pro	Ala	Ser	Asp	Leu ₁₂₅	Asp	Pro	Asp
Phe	His ₁₃₀	Asp	Gly	Lys	Arg	Thr ₁₃₅	Asn	Ala	Ile	Phe	Trp ₁₄₀	Tyr	Leu	His	Phe
Met ₁₄₅	Ile	Glu	Tyr	Ser	Ser ₁₅₀	Trp	Gln	Gln	Leu	Ile ₁₅₅	Val	Leu	Thr	Ile	Leu ₁₆₀
Phe	Asn	Leu	Ala	Lys ₁₆₅	Tyr	Val	Leu	His	Ile ₁₇₀	His	Gln	Ile	Asn	Leu ₁₇₅	Ile
Leu	Phe	Trp	Ser ₁₈₀	Ile	Pro	Pro	Ile	Leu ₁₈₅	Ser	Ser	Ile	Gln	Leu ₁₉₀	Phe	Tyr
Phe	Gly	Thr ₁₉₅	Phe	Leu	Pro	His	Arg ₂₀₀	Glu	Pro	Lys	Lys	Gly ₂₀₅	Tyr	Val	Tyr
Pro	His ₂₁₀	Cys	Ser	Gln	Thr	Ile ₂₁₅	Lys	Leu	Pro	Thr	Phe ₂₂₀	Leu	Ser	Phe	Ile
Ala ₂₂₅	Cys	Tyr	His	Phe	Gly ₂₃₀	Tyr	His	Glu	Glu	His ₂₃₅	His	Glu	Tyr	Pro	His ₂₄₀
Val	Pro	Trp	Trp	Gln ₂₄₅	Leu	Pro	Ser	Val	Tyr ₂₅₀	Lys	Gln	Arg	Val	Phe ₂₅₅	Asn
Asn	Ser	Val	Thr ₂₆₀	Asn	Ser										

<210> 11

<211> 762

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(762)

<223>

<400>	11															
atg	atc	cag	tta	gaa	caa	cca	ctc	agt	cat	caa	gca	aaa	ctg	act	cca	48
Met	Ile	Gln	Leu	Glu	Gln	Pro	Leu	Ser	His	Gln	Ala	Lys	Leu	Thr	Pro	
1				5					10					15		
gta	ctg	aga	agt	aaa	tct	cag	ttt	aag	ggg	ctt	ttc	att	gct	att	gtc	96
Val	Leu	Arg	Ser	Lys	Ser	Gln	Phe	Lys	Gly	Leu	Phe	Ile	Ala	Ile	Val	
			20					25					30			
att	gtt	agc	gca	tgg	gtc	att	agc	ctg	agt	tta	tta	ctt	tcc	ctt	gac	144
Ile	Val	Ser	Ala	Trp	Val	Ile	Ser	Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Asp	
		35					40					45				
atc	tca	aag	att	cat	aag	tgg	atg	tta	ttg	cct	gtt	ata	cta	tgg	caa	192
Ile	Ser	Lys	Ile	His	Lys	Trp	Met	Leu	Leu	Pro	Val	Ile	Leu	Trp	Gln	
	50					55					60					
aca	ttt	tta	tat	acg	gga	tta	ttt	att	aca	tct	cat	gat	gcc	atg	cat	240
Thr	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Ser	His	Asp	Ala	Met	His	
65					70					75					80	
ggc	gta	gta	ttt	ccc	caa	aac	acc	aag	att	aat	cat	ttg	att	gga	aca	288
Gly	Val	Val	Phe	Pro	Gln	Asn	Thr	Lys	Ile	Asn	His	Leu	Ile	Gly	Thr	
			85						90					95		
ttg	acc	cta	tcc	ctt	tat	ggt	ctt	tta	cca	tat	caa	aaa	cta	ttg	aaa	336
Leu	Thr	Leu	Ser	Leu	Tyr	Gly	Leu	Leu	Pro	Tyr	Gln	Lys	Leu	Leu	Lys	
			100				105						110			
aaa	cat	tgg	tta	cac	cac	cac	aat	cca	gca	agc	tca	ata	gac	ccg	gat	384
Lys	His	Trp	Leu	His	His	His	Asn	Pro	Ala	Ser	Ser	Ile	Asp	Pro	Asp	
		115					120					125				
ttt	cac	aat	ggt	aaa	cac	caa	agt	ttc	ttt	gct	tgg	tat	ttt	cat	ttt	432
Phe	His	Asn	Gly	Lys	His	Gln	Ser	Phe	Phe	Ala	Trp	Tyr	Phe	His	Phe	
	130					135					140					
atg	aaa	ggt	tac	tgg	agt	tgg	ggg	caa	ata	att	gcg	ttg	act	att	att	480
Met	Lys	Gly	Tyr	Trp	Ser	Trp	Gly	Gln	Ile	Ile	Ala	Leu	Thr	Ile	Ile	
145					150					155					160	
tat	aac	ttt	gct	aaa	tac	ata	ctc	cat	atc	cca	agt	gat	aat	cta	act	528
Tyr	Asn	Phe	Ala	Lys	Tyr	Ile	Leu	His	Ile	Pro	Ser	Asp	Asn	Leu	Thr	
				165					170					175		
tac	ttt	tgg	gtg	cta	ccc	tcg	ctt	tta	agt	tca	tta	caa	tta	ttc	tat	576
Tyr	Phe	Trp	Val	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Gln	Leu	Phe	Tyr	
			180				185						190			
ttt	ggt	act	ttt	tta	ccc	cat	agt	gaa	cca	ata	ggg	ggt	tat	gtt	cag	624
Phe	Gly	Thr	Phe	Leu	Pro	His	Ser	Glu	Pro	Ile	Gly	Gly	Tyr	Val	Gln	
		195					200				205					
cct	cat	tgt	gcc	caa	aca	att	agc	cgt	cct	att	tgg	tgg	tca	ttt	atc	672
Pro	His	Cys	Ala	Gln	Thr	Ile	Ser	Arg	Pro	Ile	Trp	Trp	Ser	Phe	Ile	
	210					215					220					
acg	tgc	tat	cat	ttt	ggc	tac	cac	gag	gaa	cat	cac	gaa	tat	cct	cat	720
Thr	Cys	Tyr	His	Phe	Gly	Tyr	His	Glu	Glu	His	His	Glu	Tyr	Pro	His	
				230						235					240	
att	tct	tgg	tgg	cag	tta	cca	gaa	att	tac	aaa	gca	aaa	tag			762
Ile	Ser	Trp	Trp	Gln	Leu	Pro	Glu	Ile	Tyr	Lys	Ala	Lys				
				245					250							

<210> 12

<211> 253

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<400> 12

Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro
 1 5 10 15

Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val
 20 25 30

Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Leu Ser Leu Asp
 35 40 45

Ile Ser Lys Ile His Lys Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln
 50 55 60

Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His
 65 70 75 80

Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr
 85 90 95

Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys
 100 105 110

Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp
 115 120 125

Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe
 130 135 140

Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile
 145 150 155 160

Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr
 165 170 175

Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr
 180 185 190

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln
 195 200 205

Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile
 210 215 220

Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His
 225 230 235 240

Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys
 245 250

<210> 13

<211> 762

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(762)

<223>

<400> 13

atg atc cag tta gaa caa cca ctc agt cat caa gca aaa ctg act cca 48
 Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro
 1 5 10 15

gta ctg aga agt aaa tct cag ttt aag ggg ctt ttc att gct att gtc 96
 Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val
 20 25 30

att gtt agc gca tgg gtc att agc ctg agt tta tta ctt tcc ctt gac 144
 Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Ser Leu Asp
 35 40 45

atc tca aag cta aaa ttt tgg atg tta ttg cct gtt ata cta tgg caa 192
 Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln
 50 55 60

aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca tct cat gat gcc atg cat 240
 Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His
 65 70 75 80

ggc gta gta ttt ccc caa aac acc aag att aat cat ttg att gga aca 288
 Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr
 85 90 95

ttg acc cta tcc ctt tat ggt ctt tta cca tat caa aaa cta ttg aaa 336
 Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys
 100 105 110

aaa cat tgg tta cac cac cac aat cca gca agc gat tta gac ccg gat 384
 Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Asp Leu Asp Pro Asp
 115 120 125

ttt cac aat ggt aaa cac caa agt ttc ttt gct tgg tat ttt cat ttt 432
 Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe
 130 135 140

atg aaa ggt tac tgg agt tgg ggg caa ata att gcg ttg act att att 480
 Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile

145	150	155	160	
tat aac ttt gct aaa tac ata ctc cat atc cca agt gat aat cta act				528
Tyr Asn Phe Ala Lys	Tyr Ile Leu His Ile	Pro Ser Asp Asn Leu	Thr	
	165	170	175	
tac ttt tgg gtg cta ccc tcg ctt tta agt tca tta caa tta ttc tat				576
Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr				
	180	185	190	
ttt ggt act ttt tta ccc cat agt gaa cca ata ggg ggt tat gtt cag				624
Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln				
	195	200	205	
cct cat tgt gcc caa aca att agc cgt cct att tgg tgg tca ttt atc				672
Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile				
	210	215	220	
acg tgc tat cat ttt ggc tac cac gag gaa cat cac gaa tat cct cat				720
Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His				
	225	230	235	240
att tct tgg tgg cag tta cca gaa att tac aaa gca aaa tag				762
Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys				
	245	250		

<210> 14

<211> 253

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<400> 14

Met	Ile	Gln	Leu	Glu	Gln	Pro	Leu	Ser	His	Gln	Ala	Lys	Leu	Thr	Pro
1				5					10					15	

Val	Leu	Arg	Ser	Lys	Ser	Gln	Phe	Lys	Gly	Leu	Phe	Ile	Ala	Ile	Val
			20					25					30		

Ile	Val	Ser	Ala	Trp	Val	Ile	Ser	Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Asp
		35					40					45			

Ile	Ser	Lys	Leu	Lys	Phe	Trp	Met	Leu	Leu	Pro	Val	Ile	Leu	Trp	Gln
	50					55					60				

Thr	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Ser	His	Asp	Ala	Met	His
	65				70					75					80

Gly	Val	Val	Phe	Pro	Gln	Asn	Thr	Lys	Ile	Asn	His	Leu	Ile	Gly	Thr
				85					90					95	

Leu	Thr	Leu	Ser	Leu	Tyr	Gly	Leu	Leu	Pro	Tyr	Gln	Lys	Leu	Leu	Lys
			100					105					110		

Lys	His	Trp	Leu	His	His	His	Asn	Pro	Ala	Ser	Asp	Leu	Asp	Pro	Asp
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

115

120

125

Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe
 130 135 140

Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile
 145 150 155 160

Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr
 165 170 175

Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr
 180 185 190

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln
 195 200 205

Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile
 210 215 220

Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His
 225 230 235 240

Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys
 245 250

<210> 15

<211> 1608

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<220>

<221> CDS

<222> (3)...(971)

<223>

<400> 15

ct aca ttt cac aag ccc gtg agc ggt gca agc gct ctg ccc cac atc 47
 Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile
 1 5 10 15

ggc cca cct cct cat ctc cat cgg tca ttt gct gct acc acg atg ctg 95
 Gly Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu
 20 25 30

tcg aag ctg cag tca atc agc gtc aag gcc cgc cgc gtt gaa cta gcc 143
 Ser Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala
 35 40 45

cgc	gac	atc	acg	cgg	ccc	aaa	gtc	tgc	ctg	cat	gct	cag	cgg	tgc	tcg	191
Arg	Asp	Ile	Thr	Arg	Pro	Lys	Val	Cys	Leu	His	Ala	Gln	Arg	Cys	Ser	
		50					55					60				
tta	ggt	cgg	ctg	cga	gtg	gca	gca	cca	cag	aca	gag	gag	gcg	ctg	gga	239
Leu	Val	Arg	Leu	Arg	Val	Ala	Ala	Pro	Gln	Thr	Glu	Glu	Ala	Leu	Gly	
	65					70					75					
acc	gtg	cag	gct	gcc	ggc	gcg	ggc	gat	gag	cac	agc	gcc	gat	gta	gca	287
Thr	Val	Gln	Ala	Ala	Gly	Ala	Gly	Asp	Glu	His	Ser	Ala	Asp	Val	Ala	
80					85					90					95	
ctc	cag	cag	ctt	gac	cgg	gct	atc	gca	gag	cgt	cgt	gcc	cgg	cgc	aaa	335
Leu	Gln	Gln	Leu	Asp	Arg	Ala	Ile	Ala	Glu	Arg	Arg	Ala	Arg	Arg	Lys	
				100					105					110		
cgg	gag	cag	ctg	tca	tac	cag	gct	gcc	gcc	att	gca	gca	tca	att	ggc	383
Arg	Glu	Gln	Leu	Ser	Tyr	Gln	Ala	Ala	Ala	Ile	Ala	Ala	Ser	Ile	Gly	
			115					120					125			
gtg	tca	ggc	att	gcc	atc	ttc	gcc	acc	tac	ctg	aga	ttt	gcc	atg	cac	431
Val	Ser	Gly	Ile	Ala	Ile	Phe	Ala	Thr	Tyr	Leu	Arg	Phe	Ala	Met	His	
		130					135					140				
atg	acc	gtg	ggc	ggc	gca	gtg	cca	tgg	ggt	gaa	gtg	gct	ggc	act	ctc	479
Met	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Val	Pro	Trp	Gly	Glu	Val	Ala	Gly	Thr	Leu	
	145					150					155					
ctc	ttg	gtg	ggt	ggc	gcg	ctc	ggc	atg	gag	atg	tat	gcc	cgc	tat		527
Leu	Leu	Val	Val	Gly	Ala	Leu	Gly	Met	Glu	Met	Tyr	Ala	Arg	Tyr		
160				165					170					175		
gca	cac	aaa	gcc	atc	tgg	cat	gag	tcg	cct	ctg	ggc	tgg	ctg	ctg	cac	575
Ala	His	Lys	Ala	Ile	Trp	His	Glu	Ser	Pro	Leu	Gly	Trp	Leu	Leu	His	
				180					185					190		
aag	agc	cac	cac	aca	cct	cgc	act	gga	ccc	ttt	gaa	gcc	aac	gac	ttg	623
Lys	Ser	His	His	Thr	Pro	Arg	Thr	Gly	Pro	Phe	Glu	Ala	Asn	Asp	Leu	
			195					200					205			
ttt	gca	atc	atc	aat	gga	ctg	ccc	gcc	atg	ctc	ctg	tgt	acc	ttt	ggc	671
Phe	Ala	Ile	Ile	Asn	Gly	Leu	Pro	Ala	Met	Leu	Leu	Cys	Thr	Phe	Gly	
		210					215					220				
ttc	tgg	ctg	ccc	aac	gtc	ctg	ggg	gcg	gcc	tgc	ttt	gga	gcg	ggg	ctg	719
Phe	Trp	Leu	Pro	Asn	Val	Leu	Gly	Ala	Ala	Cys	Phe	Gly	Ala	Gly	Leu	
	225					230					235					
ggc	atc	acg	cta	tac	ggc	atg	gca	tat	atg	ttt	gta	cac	gat	ggc	ctg	767
Gly	Ile	Thr	Leu	Tyr	Gly	Met	Ala	Tyr	Met	Phe	Val	His	Asp	Gly	Leu	
240					245					250					255	
gtg	cac	agg	cgc	ttt	ccc	acc	ggg	ccc	atc	gct	ggc	ctg	ccc	tac	atg	815
Val	His	Arg	Arg	Phe	Pro	Thr	Gly	Pro	Ile	Ala	Gly	Leu	Pro	Tyr	Met	
				260					265					270		
aag	cgc	ctg	aca	gtg	gcc	cac	cag	cta	cac	cac	agc	ggc	aag	tac	ggc	863
Lys	Arg	Leu	Thr	Val	Ala	His	Gln	Leu	His	His	Ser	Gly	Lys	Tyr	Gly	
			275					280					285			
ggc	gcg	ccc	tgg	ggt	atg	ttc	ttg	ggt	cca	cag	gag	ctg	cag	cac	att	911
Gly	Ala	Pro	Trp	Gly	Met	Phe	Leu	Gly	Pro	Gln	Glu	Leu	Gln	His	Ile	
		290					295					300				
cca	ggt	gcg	gcg	gag	gag	gtg	gag	cga	ctg	gtc	ctg	gaa	ctg	gac	tgg	959
Pro	Gly	Ala	Ala	Glu	Glu	Val	Glu	Arg	Leu	Val	Leu	Glu	Leu	Asp	Trp	
	305					310					315					

tcc aag cgg tag ggtgcggaac caggcacgct ggtttcacac ctcatgcctg 1011
 Ser Lys Arg
 320

tgataaggtg tggctagagc gatgcgtgtg agacgggtat gtcacggtcg actgggtctga 1071
 tggccaatgg catcggccat gtctgggtcat cacgggctgg ttgcctgggt gaaggtgatg 1131
 cacatcatca tgtgcggttg gaggggctgg cacagtgtgg gctgaactgg agcagttgtc 1191
 caggctggcg ttgaatcagt gaggggttgt gattggcggg tgtgaagcaa tgactccgcc 1251
 catattctat ttgtgggagc tgagatgatg gcatgcttgg gatgtgcatg gatcatggta 1311
 gtgcagcaaa ctatattcac ctagggctgt tggtaggatc aggtgaggcc ttgcacattg 1371
 catgatgtac tcgtcatggt gtgttgggtga gaggatggat gtggatggat gtgtattctc 1431
 agacgtagac cttgactgga ggcttgatcg agagagtggg ccgtattctt tgagagggga 1491
 ggctcgtgcc agaaatgggtg agtggatgac tgtgacgctg tacattgcag gcaggtgaga 1551
 tgcactgtct cgattgtaaa atacattcag atgcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1608

<210> 16

<211> 322

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 16

Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile Gly
 1 5 10 15

Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu Ser
 20 25 30

Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala Arg
 35 40 45

Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser Leu
 50 55 60

Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly Thr
 65 70 75 80

Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala Leu
 85 90 95

Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys Arg
 100 105 110

Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly Val
 115 120 125

Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His Met
 130 135 140
 Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu Leu
 145 150 155 160
 Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr Ala
 165 170 175
 His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His Lys
 180 185 190
 Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu Phe
 195 200 205
 Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly Phe
 210 215 220
 Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu Gly
 225 230 235 240
 Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu Val
 245 250 255
 His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met Lys
 260 265 270
 Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly Gly
 275 280 285
 Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile Pro
 290 295 300
 Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp Ser
 305 310 315 320

Lys Arg

<210> 17

<211> 1650

<212> DNA

<213> Lycopersicon esculentum

<220>

<221> CDS

<222> (112)..(1614)

<223>

<400> 17

```

ggcacgagga aactttttctc tcttcactag ctgtttacat gcttgaaatt tcaagatttt      60
aggaccccat ttgaagtttt cttgaaacaa atattaccct gttggaaaaa g atg gat      117
                                     Met Asp
                                     1

act ttg ttg aaa acc cca aat aac ctt gaa ttt ctg aac cca cat cat      165
Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro His His
                    5                                10                                15

ggt ttt gct gtt aaa gct agt acc ttt aga tct gag aag cat cat aat      213
Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His His Asn
                20                                25                                30

ttt ggt tct agg aag ttt tgt gaa act ttg ggt aga agt gtt tgt gtt      261
Phe Gly Ser Arg Lys Phe Cys Glu Thr Leu Gly Arg Ser Val Cys Val
35                                40                                45                                50

aag ggt agt agt agt gct ctt tta gag ctt gta cct gag acc aaa aag      309
Lys Gly Ser Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr Lys Lys
                    55                                60                                65

gag aat ctt gat ttt gag ctt cct atg tat gac cct tca aaa ggg gtt      357
Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys Gly Val
                    70                                75                                80

gtt gtg gat ctt gct gtg gtt ggt ggt ggc cct gca gga ctt gct gtt      405
Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu Ala Val
                    85                                90                                95

gca cag caa gtt tct gaa gca gga ctc tct gtt tgt tca att gat ccg      453
Ala Ala Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile Asp Pro
100                                105                                110

aat cct aaa ttg ata tgg cct aat aac tat ggt gtt tgg gtg gat gaa      501
Asn Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val Asp Glu
115                                120                                125                                130

ttt gag gct atg gac ttg tta gat tgt cta gat gct acc tgg tct ggt      549
Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Ala Thr Trp Ser Gly
135                                140                                145

gca gca gtg tac att gat gat aat acg gct aaa gat ctt cat aga cct      597
Ala Ala Val Tyr Ile Asp Asp Asn Thr Ala Lys Asp Leu His Arg Pro
150                                155                                160

tat gga agg gtt aac cgg aaa cag ctg aaa tcg aaa atg atg cag aaa      645
Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Met Gln Lys
165                                170                                175

tgt ata atg aat ggt gtt aaa ttc cac caa gcc aaa gtt ata aag gtg      693
Cys Ile Met Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile Lys Val
180                                185                                190

att cat gag gaa tcg aaa tcc atg ttg ata tgc aat gat ggt att act      741
Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Met Leu Ile Cys Asn Asp Gly Ile Thr
195                                200                                205                                210

att cag gca acg gtg gtg ctc gat gca act ggc ttc tct aga tct ctt      789
Ile Gln Ala Thr Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg Ser Leu
215                                220                                225

```

gtt Val	cag Gln	tat Tyr	gat Asp 230	aag Lys	cct Pro	tat Tyr	aac Asn	ccc Pro 235	ggg Gly	tat Tyr	caa Gln	gtt Val	gct Ala 240	tat Tyr	ggc Gly	837
att Ile	ttg Leu	gct Ala 245	gaa Glu	gtg Val	gaa Glu	gag Glu	cac His 250	ccc Pro	ttt Phe	gat Asp	gta Val	aac Asn 255	aag Lys	atg Met	gtt Val	885
ttc Phe	atg Met 260	gat Asp	tgg Trp	cga Arg	gat Asp	tct Ser 265	cat His	ttg Leu	aag Lys	aac Asn 270	aat Asn	act Thr	gat Asp	ctc Leu	aag Lys	933
gag Glu 275	aga Arg	aat Asn	agt Ser	aga Arg	ata Ile 280	cca Pro	act Thr	ttt Phe	ctt Leu	tat Tyr 285	gca Ala	atg Met	cca Pro	ttt Phe	tca Ser 290	981
tcc Ser	aac Asn	agg Arg	ata Ile	ttt Phe 295	ctt Leu	gaa Glu	gaa Glu	aca Thr	tca Ser 300	ctc Leu	gta Val	gct Ala	cgt Arg	cct Pro 305	ggc Gly	1029
ttg Leu	cgt Arg	ata Ile	gat Asp 310	gat Asp	att Ile	caa Gln	gaa Glu	cga Arg 315	atg Met	gtg Val	gct Ala	cgt Arg	tta Leu 320	aac Asn	cat His	1077
ttg Leu	ggg Gly	ata Ile 325	aaa Lys	gtg Val	aag Lys	agc Ser	att Ile 330	gaa Glu	gaa Glu	gat Asp	gaa Glu	cat His 335	tgt Cys	cta Leu	ata Ile	1125
cca Pro	atg Met 340	ggg Gly	ggg Gly	cca Pro	ctt Leu	cca Pro 345	gta Val	tta Leu	cct Pro	cag Gln	aga Arg 350	gtc Val	gtt Val	gga Gly	atc Ile	1173
ggg Gly 355	ggg Gly	aca Thr	gct Ala	ggc Gly 360	atg Met	gtt Val	cat His	cca Pro	tcc Ser	acc Thr 365	ggg Gly	tat Tyr	atg Met	gtg Val	gca Ala 370	1221
agg Arg	aca Thr	cta Leu	gct Ala	gcg Ala 375	gct Ala	cct Pro	gtt Val	gtt Val	gcc Ala 380	aat Asn	gcc Ala	ata Ile	att Ile	caa Gln 385	tac Tyr	1269
ctc Leu	ggg Gly	tct Ser	gaa Glu 390	aga Arg	agt Ser	cat His	tcg Ser	ggg Gly 395	aat Asn	gaa Glu	tta Leu	tcc Ser	aca Thr 400	gct Ala	gtt Val	1317
tgg Trp	aaa Lys	gat Asp 405	ttg Leu	tgg Trp	cct Pro	ata Ile	gag Glu 410	agg Arg	aga Arg	cgt Arg	caa Gln	aga Arg 415	gag Glu	ttc Phe	ttc Phe	1365
tgc Cys	ttc Phe 420	ggg Gly	atg Met	gat Asp	att Ile	ctt Leu 425	ctg Leu	aag Lys	ctt Leu	gat Asp	tta Leu 430	cct Pro	gct Ala	aca Thr	aga Arg	1413
agg Arg 435	ttc Phe	ttt Phe	gat Asp	gca Ala	ttc Phe 440	ttt Phe	gac Asp	tta Leu	gaa Glu	cct Pro 445	cgt Arg	tat Tyr	tgg Trp	cat His	ggc Gly 450	1461
ttc Phe	tta Leu	tcg Ser	tct Ser	cga Arg 455	ttg Leu	ttt Phe	cta Leu	cct Pro	gaa Glu 460	ctc Leu	ata Ile	gtt Val	ttt Phe	ggg Gly 465	ctg Leu	1509
tct Ser	cta Leu	ttc Phe 470	tct Ser	cat His	gct Ala	tca Ser	aat Asn	act Thr 475	tct Ser	aga Arg	ttt Phe	gag Glu 480	ata Ile	atg Met	aca Thr	1557
aag Lys	gga Gly	act Thr 485	gtt Val	cca Pro	tta Leu	gta Val	aat Asn 490	atg Met	atc Ile	aac Asn	aat Asn	ttg Leu 495	tta Leu	cag Gln	gat Asp	1605

aaa gaa tga atccgagtaa ttcggaatct tgtccaatct cgtgcc
 Lys Glu
 500

1650

<210> 18

<211> 500

<212> PRT

<213> Lycopersicon esculentum

<400> 18

Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro
 1 5 10 15

His His Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His
 20 25 30

His Asn Phe Gly Ser Arg Lys Phe Cys Glu Thr Leu Gly Arg Ser Val
 35 40 45

Cys Val Lys Gly Ser Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr
 50 55 60

Lys Lys Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys
 65 70 75 80

Gly Val Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu
 85 90 95

Ala Val Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile
 100 105 110

Asp Pro Asn Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val
 115 120 125

Asp Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Ala Thr Trp
 130 135 140

Ser Gly Ala Ala Val Tyr Ile Asp Asp Asn Thr Ala Lys Asp Leu His
 145 150 155 160

Arg Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Met
 165 170 175

Gln Lys Cys Ile Met Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile
 180 185 190

Lys Val Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Met Leu Ile Cys Asn Asp Gly
 195 200 205

Ile Thr Ile Gln Ala Thr Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg
 210 215 220
 Ser Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala
 225 230 235 240
 Tyr Gly Ile Leu Ala Glu Val Glu Glu His Pro Phe Asp Val Asn Lys
 245 250 255
 Met Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Lys Asn Asn Thr Asp
 260 265 270
 Leu Lys Glu Arg Asn Ser Arg Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro
 275 280 285
 Phe Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg
 290 295 300
 Pro Gly Leu Arg Ile Asp Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu
 305 310 315 320
 Asn His Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys
 325 330 335
 Leu Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val
 340 345 350
 Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met
 355 360 365
 Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile
 370 375 380
 Gln Tyr Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr
 385 390 395 400
 Ala Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu
 405 410 415
 Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala
 420 425 430
 Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp
 435 440 445
 His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe
 450 455 460
 Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile
 465 470 475 480

Met Thr Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu
 485 490 495

Gln Asp Lys Glu
 500

<210> 19

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(33)

<223>

<400> 19

gcatgctcta gaccttataa agatattttg tga

33

<210> 20

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(33)

<223>

<400> 20

gcatgcatct agaaatggtt cagtgtcaac cat

33

<210> 21

<211> 805

<212> DNA

<213> Nostoc sp. Strain PCC7120

<220>

<221> variation

<222> (1)..(805)

<223>

<400> 21

```

gcatgcatct agaaatgggt cagtgtcaac catcatctct gcattcagaa aaactgggtgt    60
tattgtcatc gacaatcaga gatgataaaa atattaataa gggatatattt attgcctgct    120
ttatcttatt tttatgggca attagtttaa tcttattact ctcaatagat acatccataa    180
ttcataagag cttattaggt atagccatgc tttggcagac cttcttatat acaggtttat    240
ttattactgc tcatgatgcc atgcacggcg tagtttatcc caaaaatccc agaataaata    300
attttatagg taagctcact ctaatcttgt atggactact cccttataaa gatttattga    360
aaaaacattg gttacaccac ggacatcctg gtactgattt agaccctgat tattacaatg    420
gtcatcccca aaacttcttt ctttgggtatc tacattttat gaagtcttat tggcgatgga    480
cgcaaatttt cggattagtg atgatttttc atggacttaa aaatctggtg catataccag    540
aaaataattt aatttatattt tggatgatac cttctatttt aagttcagta caactatttt    600
attttggtag atttttgcct cataaaaagc tagaagggtg ttatactaac cccattgtg    660
cgcgcagtat ccattacct cttttttggt cttttgttac ttgttatcac ttcggctacc    720
acaaggaaca tcacgaatac cctcaacttc cttggtggaa attacctgaa gctcacaaaa    780
tatctttata aggtctagag catgc                                           805

```

<210> 22

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(24)

<223>

<400> 22

```

aggtaccgca cggtctgcc atcc                                           24

```

<210> 23

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(26)

<223>

<400> 23

aagcttgacc tgattatcag cacggt

26

<210> 24

<211> 4624

<212> DNA

<213> Erwinia uredovora

<220>

<221> CDS

<222> (128)..(1267)

<223>

<220>

<221> CDS

<222> (1288)..(2766)

<223>

<220>

<221> CDS

<222> (2802)..(3689)

<223>

<220>

<221> iDNA

<222> (3631)..(4158)

<223>

<400> 24
gtcgcactttc agcagcgcacat ggcgaaaatc cagacagccc ttcgtttggc agggggcacc 60
atggccgctg ccgatatcat tgagcaggtt atgtgcaccg gtcagcctgt cttaagtggg 120
agcggct atg caa ccg cat tat gat ctg att ctc gtg ggg gct gga ctc 169
Met Gln Pro His Tyr Asp Leu Ile Leu Val Gly Ala Gly Leu 10
gcg aat ggc ctt atc gcc ctg cgt ctt cag cag cag caa cct gat atg 217
Ala Asn Gly Leu Ile Ala Leu Arg Leu Gln Gln Gln Pro Asp Met 15 20 25 30
cgt att ttg ctt atc gac gcc gca ccc cag gcg ggc ggg aat cat acg 265
Arg Ile Leu Leu Ile Asp Ala Ala Pro Gln Ala Gly Gly Asn His Thr 35 40 45
tgg tca ttt cac cac gat gat ttg act gag agc caa cat cgt tgg ata 313
Trp Ser Phe His His Asp Asp Leu Thr Glu Ser Gln His Arg Trp Ile 50 55 60
gct ccg ctg gtg gtt cat cac tgg ccc gac tat cag gta cgc ttt ccc 361
Ala Pro Leu Val Val His His Trp Pro Asp Tyr Gln Val Arg Phe Pro 65 70 75
aca cgc cgt cgt aag ctg aac agc ggc tac ttt tgt att act tct cag 409
Thr Arg Arg Arg Lys Leu Asn Ser Gly Tyr Phe Cys Ile Thr Ser Gln 80 85 90
cgt ttc gct gag gtt tta cag cga cag ttt ggc ccg cac ttg tgg atg 457
Arg Phe Ala Glu Val Leu Gln Arg Gln Phe Gly Pro His Leu Trp Met 95 100 105 110
gat acc gcg gtc gca gag gtt aat gcg gaa tct gtt cgg ttg aaa aag 505
Asp Thr Ala Val Ala Glu Val Asn Ala Glu Ser Val Arg Leu Lys Lys 115 120 125
ggc cag gtt atc ggt gcc cgc gcg gtg att gac ggg cgg ggt tat gcg 553
Gly Gln Val Ile Gly Ala Arg Ala Val Ile Asp Gly Arg Tyr Ala 130 135 140
gca aat tca gca ctg agc gtg ggc ttc cag gcg ttt att ggc cag gaa 601
Ala Asn Ser Ala Leu Ser Val Gly Phe Gln Ala Phe Ile Gly Gln Glu 145 150 155
tgg cga ttg agc cac ccg cat ggt tta tcg tct ccc att atc atg gat 649
Trp Arg Leu Ser His Pro His Gly Leu Ser Ser Pro Ile Ile Met Asp 160 165 170
gcc acg gtc gat cag caa aat ggt tat cgc ttc gtg tac agc ctg ccg 697
Ala Thr Val Asp Gln Gln Asn Gly Tyr Arg Phe Val Tyr Ser Leu Pro 175 180 185 190
ctc tcg ccg acc aga ttg tta att gaa gac acg cac tat att gat aat 745
Leu Ser Pro Thr Arg Leu Leu Ile Glu Asp Thr His Tyr Ile Asp Asn 195 200 205
gcg aca tta gat cct gaa tgc gcg cgg caa aat att tgc gac tat gcc 793
Ala Thr Leu Asp Pro Glu Cys Ala Arg Gln Asn Ile Cys Asp Tyr Ala 210 215 220
gcg caa cag ggt tgg cag ctt cag aca ctg ctg cga gaa gaa cag ggc 841
Ala Gln Gln Gly Trp Gln Leu Gln Thr Leu Leu Arg Glu Glu Gln Gly 225 230 235
gcc tta ccc att act ctg tcg ggc aat gcc gac gca ttc tgg cag cag 889
Ala Leu Pro Ile Thr Leu Ser Gly Asn Ala Asp Ala Phe Trp Gln Gln

240	245	250	
cgc ccc ctg gcc tgt agt gga tta cgt gcc ggt ctg ttc cat cct acc Arg Pro Leu Ala Cys Ser Gly Leu Arg Ala Gly Leu Phe His Pro Thr 255 260 265 270			937
acc ggc tat tca ctg ccg ctg gcg gtt gcc gtg gcc gac cgc ctg agt Thr Gly Tyr Ser Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala Asp Arg Leu Ser 275 280 285			985
gca ctt gat gtc ttt acg tcg gcc tca att cac cat gcc att acg cat Ala Leu Asp Val Phe Thr Ser Ala Ser Ile His His Ala Ile Thr His 290 295 300			1033
ttt gcc cgc gag cgc tgg cag cag cag ggc ttt ttc cgc atg ctg aat Phe Ala Arg Glu Arg Trp Gln Gln Gln Gly Phe Phe Arg Met Leu Asn 305 310 315			1081
cgc atg ctg ttt tta gcc gga ccc gcc gat tca cgc tgg cgg gtt atg Arg Met Leu Phe Leu Ala Gly Pro Ala Asp Ser Arg Trp Arg Val Met 320 325 330			1129
cag cgt ttt tat ggt tta cct gaa gat tta att gcc cgt ttt tat gcg Gln Arg Phe Tyr Gly Leu Pro Glu Asp Leu Ile Ala Arg Phe Tyr Ala 335 340 345 350			1177
gga aaa ctc acg ctg acc gat cgg cta cgt att ctg agc ggc aag ccg Gly Lys Leu Thr Leu Thr Asp Arg Leu Arg Ile Leu Ser Gly Lys Pro 355 360 365			1225
cct gtt ccg gta tta gca gca ttg caa gcc att atg acg act Pro Val Pro Val Leu Ala Ala Leu Gln Ala Ile Met Thr Thr 370 375 380			1267
catcgttaaa gagcgcactac atg aaa cca act acg gta att ggt gca ggc ttc Met Lys Pro Thr Thr Val Ile Gly Ala Gly Phe 385 390			1320
ggt ggc ctg gca ctg gca att cgt cta caa gct gcg ggg atc ccc gtc Gly Gly Leu Ala Leu Ala Ile Arg Leu Gln Ala Ala Gly Ile Pro Val 395 400 405			1368
tta ctg ctt gaa caa cgt gat aaa ccc ggc ggt cgg gct tat gtc tac Leu Leu Leu Glu Gln Arg Asp Lys Pro Gly Gly Arg Ala Tyr Val Tyr 410 415 420			1416
gag gat cag ggg ttt acc ttt gat gca ggc ccg acg gtt atc acc gat Glu Asp Gln Gly Phe Thr Phe Asp Ala Gly Pro Thr Val Ile Thr Asp 425 430 435			1464
ccc agt gcc att gaa gaa ctg ttt gca ctg gca gga aaa cag tta aaa Pro Ser Ala Ile Glu Glu Leu Phe Ala Leu Ala Gly Lys Gln Leu Lys 440 445 450 455			1512
gag tat gtc gaa ctg ctg ccg gtt acg ccg ttt tac cgc ctg tgt tgg Glu Tyr Val Glu Leu Leu Pro Val Thr Pro Phe Tyr Arg Leu Cys Trp 460 465 470			1560
gag tca ggg aag gtc ttt aat tac gat aac gat caa acc cgg ctc gaa Glu Ser Gly Lys Val Phe Asn Tyr Asp Asn Asp Gln Thr Arg Leu Glu 475 480 485			1608
gcg cag att cag cag ttt aat ccc cgc gat gtc gaa ggt tat cgt cag Ala Gln Ile Gln Gln Phe Asn Pro Arg Asp Val Glu Gly Tyr Arg Gln 490 495 500			1656
ttt ctg gac tat tca cgc gcg gtg ttt aaa gaa ggc tat cta aag ctc Phe Leu Asp Tyr Ser Arg Ala Val Phe Lys Glu Gly Tyr Leu Lys Leu			1704

505	510	515	
ggt act gtc cct ttt tta tcg ttc aga gac atg ctt cgc gcc gca cct Gly Thr Val Pro Phe Leu Ser Phe Arg Asp Met Leu Arg Ala Ala Pro 520 525 530 535			1752
caa ctg gcg aaa ctg cag gca tgg aga agc gtt tac agt aag gtt gcc Gln Leu Ala Lys Leu Gln Ala Trp Arg Ser Val Tyr Ser Lys Val Ala 540 545 550			1800
agt tac atc gaa gat gaa cat ctg cgc cag gcg ttt tct ttc cac tcg Ser Tyr Ile Glu Asp Glu His Leu Arg Gln Ala Phe Ser Phe His Ser 555 560 565			1848
ctg ttg gtg ggc ggc aat ccc ttc gcc acc tca tcc att tat acg ttg Leu Leu Val Gly Gly Asn Pro Phe Ala Thr Ser Ser Ile Tyr Thr Leu 570 575 580			1896
ata cac gcg ctg gag cgt gag tgg ggc gtc tgg ttt ccg cgt ggc ggc Ile His Ala Leu Glu Arg Glu Trp Gly Val Trp Phe Pro Arg Gly Gly 585 590 595			1944
acc ggc gca tta gtt cag ggg atg ata aag ctg ttt cag gat ctg ggt Thr Gly Ala Leu Val Gln Gly Met Ile Lys Leu Phe Gln Asp Leu Gly 600 605 610 615			1992
ggc gaa gtc gtg tta aac gcc aga gtc agc cat atg gaa acg aca gga Gly Glu Val Val Leu Asn Ala Arg Val Ser His Met Glu Thr Thr Gly 620 625 630			2040
aac aag att gaa gcc gtg cat tta gag gac ggt cgc agg ttc ctg acg Asn Lys Ile Glu Ala Val His Leu Glu Asp Gly Arg Arg Phe Leu Thr 635 640 645			2088
caa gcc gtc gcg tca aat gca gat gtg gtt cat acc tat cgc gac ctg Gln Ala Val Ala Ser Asn Ala Asp Val Val His Thr Tyr Arg Asp Leu 650 655 660			2136
tta agc cag cac cct gcc gcg gtt aag cag tcc aac aaa ctg cag act Leu Ser Gln His Pro Ala Ala Val Lys Gln Ser Asn Lys Leu Gln Thr 665 670 675			2184
aag cgc atg agt aac tct ctg ttt gtg ctc tat ttt ggt ttg aat cac Lys Arg Met Ser Asn Ser Leu Phe Val Leu Tyr Phe Gly Leu Asn His 680 685 690 695			2232
cat cat gat cag ctc gcg cat cac acg gtt tgt ttc ggc ccg cgt tac His His Asp Gln Leu Ala His His Thr Val Cys Phe Gly Pro Arg Tyr 700 705 710			2280
cgc gag ctg att gac gaa att ttt aat cat gat ggc ctc gca gag gac Arg Glu Leu Ile Asp Glu Ile Phe Asn His Asp Gly Leu Ala Glu Asp 715 720 725			2328
ttc tca ctt tat ctg cac gcg ccc tgt gtc acg gat tcg tca ctg gcg Phe Ser Leu Tyr Leu His Ala Pro Cys Val Thr Asp Ser Ser Leu Ala 730 735 740			2376
cct gaa ggt tgc ggc agt tac tat gtg ttg gcg ccg gtg ccg cat tta Pro Glu Gly Cys Gly Ser Tyr Tyr Val Leu Ala Pro Val Pro His Leu 745 750 755			2424
ggc acc gcg aac ctc gac tgg acg gtt gag ggg cca aaa cta cgc gac Gly Thr Ala Asn Leu Asp Trp Thr Val Glu Gly Pro Lys Leu Arg Asp 760 765 770 775			2472
cgt att ttt gcg tac ctt gag cag cat tac atg cct ggc tta cgg agt Arg Ile Phe Ala Tyr Leu Glu Gln His Tyr Met Pro Gly Leu Arg Ser			2520

780								785					790						
cag	ctg	gtc	acg	cac	cgg	atg	ttt	acg	ccg	ttt	gat	ttt	cgc	gac	cag	2568			
Gln	Leu	Val	Thr	His	Arg	Met	Phe	Thr	Pro	Phe	Asp	Phe	Arg	Asp	Gln				
795								800					805						
ctt	aat	gcc	tat	cat	ggc	tca	gcc	ttt	tct	gtg	gag	ccc	gtt	ctt	acc	2616			
Leu	Asn	Ala	Tyr	His	Gly	Ser	Ala	Phe	Ser	Val	Glu	Pro	Val	Leu	Thr				
810								815					820						
cag	agc	gcc	tgg	ttt	cgg	ccg	cat	aac	cgc	gat	aaa	acc	att	act	aat	2664			
Gln	Ser	Ala	Trp	Phe	Arg	Pro	His	Asn	Arg	Asp	Lys	Thr	Ile	Thr	Asn				
825								830					835						
ctc	tac	ctg	gtc	ggc	gca	ggc	acg	cat	ccc	ggc	gca	ggc	att	cct	ggc	2712			
Leu	Tyr	Leu	Val	Gly	Ala	Gly	Thr	His	Pro	Gly	Ala	Gly	Ile	Pro	Gly				
840								845					850						
gtc	atc	ggc	tgc	gca	aaa	gcg	aca	gca	ggt	ttg	atg	ctg	gag	gat	ctg	2760			
Val	Ile	Gly	Ser	Ala	Lys	Ala	Thr	Ala	Gly	Leu	Met	Leu	Glu	Asp	Leu				
860								865					870						
att	tga	ataatccg	gtc	gttactcaat	catgcggtcg	aaacg	atg	gca	gtt	ggc						2813			
Ile							Met	Ala	Val	Gly									
875																			
tcg	aaa	agt	ttt	gcg	aca	gcc	tca	aag	tta	ttt	gat	gca	aaa	acc	cgg	2861			
Ser	Lys	Ser	Phe	Ala	Thr	Ala	Ser	Lys	Leu	Phe	Asp	Ala	Lys	Thr	Arg				
880								885					890						
cgc	agc	gta	ctg	atg	ctc	tac	gcc	tgg	tgc	cgc	cat	tgt	gac	gat	gtt	2909			
Arg	Ser	Val	Leu	Met	Leu	Tyr	Ala	Trp	Cys	Arg	His	Cys	Asp	Asp	Val				
895								900					905						
att	gac	gat	cag	acg	ctg	ggc	ttt	cag	gcc	cgg	cag	cct	gcc	tta	caa	2957			
Ile	Asp	Asp	Gln	Thr	Leu	Gly	Phe	Gln	Ala	Arg	Gln	Pro	Ala	Leu	Gln				
910								915					920						
acg	ccc	gaa	caa	cgt	ctg	atg	caa	ctt	gag	atg	aaa	acg	cgc	cag	gcc	3005			
Thr	Pro	Glu	Gln	Arg	Leu	Met	Gln	Leu	Glu	Met	Lys	Thr	Arg	Gln	Ala				
925								930					935					940	
tat	gca	gga	tgc	cag	atg	cac	gaa	ccg	gcg	ttt	gcg	gct	ttt	cag	gaa	3053			
Tyr	Ala	Gly	Ser	Gln	Met	His	Glu	Pro	Ala	Phe	Ala	Ala	Phe	Gln	Glu				
945								950					955						
gtg	gct	atg	gct	cat	gat	atc	gcc	ccg	gct	tac	gcg	ttt	gat	cat	ctg	3101			
Val	Ala	Met	Ala	His	Asp	Ile	Ala	Pro	Ala	Tyr	Ala	Phe	Asp	His	Leu				
960								965					970						
gaa	ggc	ttc	gcc	atg	gat	gta	cgc	gaa	gcg	caa	tac	agc	caa	ctg	gat	3149			
Glu	Gly	Phe	Ala	Met	Asp	Val	Arg	Glu	Ala	Gln	Tyr	Ser	Gln	Leu	Asp				
975								980					985						
gat	acg	ctg	cgc	tat	tgc	tat	cac	gtt	gca	ggc	gtt	gtc	ggc	ttg	atg	3197			
Asp	Thr	Leu	Arg	Tyr	Cys	Tyr	His	Val	Ala	Gly	Val	Val	Gly	Leu	Met				
990								995					1000						
atg	gcg	caa	atc	atg	ggc	gtg	cgg	gat	aac	gcc	acg	ctg	gac	cgc		3242			
Met	Ala	Gln	Ile	Met	Gly	Val	Arg	Asp	Asn	Ala	Thr	Leu	Asp	Arg					
1005								1010					1015						
gcc	tgt	gac	ctt	ggg	ctg	gca	ttt	cag	ttg	acc	aat	att	gct	cgc		3287			
Ala	Cys	Asp	Leu	Gly	Leu	Ala	Phe	Gln	Leu	Thr	Asn	Ile	Ala	Arg					
1020								1025					1030						
gat	att	gtg	gac	gat	gcg	cat	gcg	ggc	cgc	tgt	tat	ctg	ccg	gca		3332			
Asp	Ile	Val	Asp	Asp	Ala	His	Ala	Gly	Arg	Cys	Tyr	Leu	Pro	Ala					

1035	1040	1045	
agc tgg ctg gag cat Ser Trp Leu Glu His 1050	gaa ggt ctg aac aaa Glu Gly Leu Asn Lys 1055	gag aat tat gcg gca Glu Asn Tyr Ala Ala 1060	3377
cct gaa aac cgt cag Pro Glu Asn Arg Gln 1065	gcg ctg agc cgt atc Ala Leu Ser Arg Ile 1070	gcc cgt cgt ttg gtg Ala Arg Arg Leu Val 1075	3422
cag gaa gca gaa cct Gln Glu Ala Glu Pro 1080	tac tat ttg tct gcc Tyr Tyr Leu Ser Ala 1085	aca gcc ggc ctg gca Thr Ala Gly Leu Ala 1090	3467
ggg ttg ccc ctg cgt Gly Leu Pro Leu Arg 1095	tcc gcc tgg gca atc Ser Ala Trp Ala Ile 1100	gct acg gcg aag cag Ala Thr Ala Lys Gln 1105	3512
gtt tac cgg aaa ata Val Tyr Arg Lys Ile 1110	ggt gtc aaa gtt gaa Gly Val Lys Val Glu 1115	cag gcc ggt cag caa Gln Ala Gly Gln Gln 1120	3557
gcc tgg gat cag cgg Ala Trp Asp Gln Arg 1125	cag tca acg acc acg Gln Ser Thr Thr Thr 1130	ccc gaa aaa tta acg Pro Glu Lys Leu Thr 1135	3602
ctg ctg ctg gcc gcc Leu Leu Leu Ala Ala 1140	tct ggt cag gcc ctt Ser Gly Gln Ala Leu 1145	act tcc cgg atg cgg Thr Ser Arg Met Arg 1150	3647
gct cat cct ccc cgc Ala His Pro Pro Arg 1155	cct gcg cat ctc tgg Pro Ala His Leu Trp 1160	cag cgc ccg ctc Gln Arg Pro Leu 1165	3689
tagcgccatg tctttcccgg agcgtcgcct gaagttttga caggggaggc gcatagagga			3749
agccaaaaga aacacaacct tctttgcccc tgacggcgtg atgcatacgg tgcgccatat			3809
acaaccgttt gaggtagccc ttgcgtggaa tatagcggaa tggccaacgt tgatgcacca			3869
gcccgtcgtg caccataaaa tagagtaatc catacgccgt catacctgcg ccaatccact			3929
ggagcggcca cattcctgta ctgccagat aaatcagcag gatcgataat gcagcaaaaa			3989
ccacggcata aagatcgta acttcaaacg cacctttacg cggttcatga tgtgaaagat			4049
gccatcccca accccagccg tgcgatgtgt atttgtgtgc cagtgcagca atcacttcca			4109
tgccaatcac ggtaacgaaa acgatcaggg cattccaaat ccacaacata atttctccgg			4169
tagagacgtc tggcagcagg cttaaggatt caattttaac agagattagc cgatctggcg			4229
gcgggaaggg aaaaaggcgc gccagaaagg cgcgccaggg atcagaagtc ggctttcaga			4289
accacacggt agttggcttt acctgcacga acatgggtcca gtgcatcgtt gattttcgac			4349
atcggaaggt actccactgt cggcgcaata tctgtacggc cagccagctt cagcagtga			4409
cgcagctgcg caggtgaacc ggttgaagaa cccgtcacgg cgcggtcgcc taaaatcagg			4469
ctgaaagccg ggcacgtcaa acggcttcag tacggcacc acggtatgga acttaccgcg			4529
aggcgccagg gccgcaaagt agggttgcc gtcgagatcg acggcgaccg tgctgataat			4589
caggtcaaac tggcccgcga ggctttttaa agctt			4624

<210> 25

<211> 380

<212> PRT

<213> *Erwinia uredovora*

<400> 25

Met Gln Pro His Tyr Asp Leu Ile Leu Val Gly Ala Gly Leu Ala Asn
 1 5 10 15

Gly Leu Ile Ala Leu Arg Leu Gln Gln Gln Gln Pro Asp Met Arg Ile
 20 25 30

Leu Leu Ile Asp Ala Ala Pro Gln Ala Gly Gly Asn His Thr Trp Ser
 35 40 45

Phe His His Asp Asp Leu Thr Glu Ser Gln His Arg Trp Ile Ala Pro
 50 55 60

Leu Val Val His His Trp Pro Asp Tyr Gln Val Arg Phe Pro Thr Arg
 65 70 75 80

Arg Arg Lys Leu Asn Ser Gly Tyr Phe Cys Ile Thr Ser Gln Arg Phe
 85 90 95

Ala Glu Val Leu Gln Arg Gln Phe Gly Pro His Leu Trp Met Asp Thr
 100 105 110

Ala Val Ala Glu Val Asn Ala Glu Ser Val Arg Leu Lys Lys Gly Gln
 115 120 125

Val Ile Gly Ala Arg Ala Val Ile Asp Gly Arg Gly Tyr Ala Ala Asn
 130 135 140

Ser Ala Leu Ser Val Gly Phe Gln Ala Phe Ile Gly Gln Glu Trp Arg
 145 150 155 160

Leu Ser His Pro His Gly Leu Ser Ser Pro Ile Ile Met Asp Ala Thr
 165 170 175

Val Asp Gln Gln Asn Gly Tyr Arg Phe Val Tyr Ser Leu Pro Leu Ser
 180 185 190

Pro Thr Arg Leu Leu Ile Glu Asp Thr His Tyr Ile Asp Asn Ala Thr
 195 200 205

Leu Asp Pro Glu Cys Ala Arg Gln Asn Ile Cys Asp Tyr Ala Ala Gln
 210 215 220

Gln Gly Trp Gln Leu Gln Thr Leu Leu Arg Glu Glu Gln Gly Ala Leu

225 230 235 240
 Pro Ile Thr Leu Ser Gly Asn Ala Asp Ala Phe Trp Gln Gln Arg Pro
 245 250 255
 Leu Ala Cys Ser Gly Leu Arg Ala Gly Leu Phe His Pro Thr Thr Gly
 260 265 270
 Tyr Ser Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala Asp Arg Leu Ser Ala Leu
 275 280 285
 Asp Val Phe Thr Ser Ala Ser Ile His His Ala Ile Thr His Phe Ala
 290 295 300
 Arg Glu Arg Trp Gln Gln Gln Gly Phe Phe Arg Met Leu Asn Arg Met
 305 310 315 320
 Leu Phe Leu Ala Gly Pro Ala Asp Ser Arg Trp Arg Val Met Gln Arg
 325 330 335
 Phe Tyr Gly Leu Pro Glu Asp Leu Ile Ala Arg Phe Tyr Ala Gly Lys
 340 345 350
 Leu Thr Leu Thr Asp Arg Leu Arg Ile Leu Ser Gly Lys Pro Pro Val
 355 360 365
 Pro Val Leu Ala Ala Leu Gln Ala Ile Met Thr Thr
 370 375 380

 <210> 26
 <211> 492
 <212> PRT
 <213> Erwinia uredovora

 <400> 26
 Met Lys Pro Thr Thr Val Ile Gly Ala Gly Phe Gly Gly Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Ala Ile Arg Leu Gln Ala Ala Gly Ile Pro Val Leu Leu Leu Glu Gln
 20 25 30
 Arg Asp Lys Pro Gly Gly Arg Ala Tyr Val Tyr Glu Asp Gln Gly Phe
 35 40 45
 Thr Phe Asp Ala Gly Pro Thr Val Ile Thr Asp Pro Ser Ala Ile Glu
 50 55 60
 Glu Leu Phe Ala Leu Ala Gly Lys Gln Leu Lys Glu Tyr Val Glu Leu

65		70		75		80									
Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Phe	Tyr	Arg	Leu	Cys	Trp	Glu	Ser	Gly	Lys	Val
				85					90					95	
Phe	Asn	Tyr	Asp	Asn	Asp	Gln	Thr	Arg	Leu	Glu	Ala	Gln	Ile	Gln	Gln
			100					105					110		
Phe	Asn	Pro	Arg	Asp	Val	Glu	Gly	Tyr	Arg	Gln	Phe	Leu	Asp	Tyr	Ser
		115					120					125			
Arg	Ala	Val	Phe	Lys	Glu	Gly	Tyr	Leu	Lys	Leu	Gly	Thr	Val	Pro	Phe
	130					135					140				
Leu	Ser	Phe	Arg	Asp	Met	Leu	Arg	Ala	Ala	Pro	Gln	Leu	Ala	Lys	Leu
145					150					155					160
Gln	Ala	Trp	Arg	Ser	Val	Tyr	Ser	Lys	Val	Ala	Ser	Tyr	Ile	Glu	Asp
				165					170					175	
Glu	His	Leu	Arg	Gln	Ala	Phe	Ser	Phe	His	Ser	Leu	Leu	Val	Gly	Gly
			180					185					190		
Asn	Pro	Phe	Ala	Thr	Ser	Ser	Ile	Tyr	Thr	Leu	Ile	His	Ala	Leu	Glu
		195					200					205			
Arg	Glu	Trp	Gly	Val	Trp	Phe	Pro	Arg	Gly	Gly	Thr	Gly	Ala	Leu	Val
	210					215					220				
Gln	Gly	Met	Ile	Lys	Leu	Phe	Gln	Asp	Leu	Gly	Gly	Glu	Val	Val	Leu
225					230					235					240
Asn	Ala	Arg	Val	Ser	His	Met	Glu	Thr	Thr	Gly	Asn	Lys	Ile	Glu	Ala
				245					250					255	
Val	His	Leu	Glu	Asp	Gly	Arg	Arg	Phe	Leu	Thr	Gln	Ala	Val	Ala	Ser
			260					265					270		
Asn	Ala	Asp	Val	Val	His	Thr	Tyr	Arg	Asp	Leu	Leu	Ser	Gln	His	Pro
		275					280					285			
Ala	Ala	Val	Lys	Gln	Ser	Asn	Lys	Leu	Gln	Thr	Lys	Arg	Met	Ser	Asn
	290					295					300				
Ser	Leu	Phe	Val	Leu	Tyr	Phe	Gly	Leu	Asn	His	His	His	Asp	Gln	Leu
305					310					315					320
Ala	His	His	Thr	Val	Cys	Phe	Gly	Pro	Arg	Tyr	Arg	Glu	Leu	Ile	Asp
				325					330					335	
Glu	Ile	Phe	Asn	His	Asp	Gly	Leu	Ala	Glu	Asp	Phe	Ser	Leu	Tyr	Leu

340

345

350

His Ala Pro Cys Val Thr Asp Ser Ser Leu Ala Pro Glu Gly Cys Gly
 355 360 365

Ser Tyr Tyr Val Leu Ala Pro Val Pro His Leu Gly Thr Ala Asn Leu
 370 375 380

Asp Trp Thr Val Glu Gly Pro Lys Leu Arg Asp Arg Ile Phe Ala Tyr
 385 390 395 400

Leu Glu Gln His Tyr Met Pro Gly Leu Arg Ser Gln Leu Val Thr His
 405 410 415

Arg Met Phe Thr Pro Phe Asp Phe Arg Asp Gln Leu Asn Ala Tyr His
 420 425 430

Gly Ser Ala Phe Ser Val Glu Pro Val Leu Thr Gln Ser Ala Trp Phe
 435 440 445

Arg Pro His Asn Arg Asp Lys Thr Ile Thr Asn Leu Tyr Leu Val Gly
 450 455 460

Ala Gly Thr His Pro Gly Ala Gly Ile Pro Gly Val Ile Gly Ser Ala
 465 470 475 480

Lys Ala Thr Ala Gly Leu Met Leu Glu Asp Leu Ile
 485 490

<210> 27

<211> 296

<212> PRT

<213> Erwinia uredovora

<400> 27

Met Ala Val Gly Ser Lys Ser Phe Ala Thr Ala Ser Lys Leu Phe Asp
 1 5 10 15

Ala Lys Thr Arg Arg Ser Val Leu Met Leu Tyr Ala Trp Cys Arg His
 20 25 30

Cys Asp Asp Val Ile Asp Asp Gln Thr Leu Gly Phe Gln Ala Arg Gln
 35 40 45

Pro Ala Leu Gln Thr Pro Glu Gln Arg Leu Met Gln Leu Glu Met Lys
 50 55 60

Thr Arg Gln Ala Tyr Ala Gly Ser Gln Met His Glu Pro Ala Phe Ala

65	70	75	80
Ala Phe Gln Glu Val 85	Ala Met Ala His	Asp Ile Ala Pro Ala 90	Tyr Ala 95
Phe Asp His Leu 100	Glu Gly Phe Ala Met 105	Asp Val Arg Glu Ala 110	Gln Tyr
Ser Gln Leu 115	Asp Asp Thr Leu Arg 120	Tyr Cys Tyr His Val 125	Ala Gly Val
Val Gly 130	Leu Met Met Ala Gln 135	Ile Met Gly Val Arg 140	Asp Asn Ala Thr
Leu Asp Arg Ala Cys 145	Asp Leu Gly Leu Ala 150	Phe Gln Leu Thr Asn 155	Ile 160
Ala Arg Asp Ile 165	Val Asp Asp Ala His 170	Ala Gly Arg Cys Tyr 175	Leu Pro
Ala Ser Trp Leu 180	Glu His Glu Gly Leu 185	Asn Lys Glu Asn Tyr 190	Ala Ala
Pro Glu Asn 195	Arg Gln Ala Leu Ser 200	Arg Ile Ala Arg Arg 205	Leu Val Gln
Glu Ala Glu Pro Tyr Tyr 210	Leu Ser Ala Thr Ala 215	Gly Leu Ala Gly Leu 220	
Pro Leu Arg Ser Ala 225	Trp Ala Ile Ala Thr 230	Ala Lys Gln Val Tyr 235	Arg 240
Lys Ile Gly Val 245	Lys Val Glu Gln Ala 250	Gly Gln Gln Ala Trp 255	Asp Gln
Arg Gln Ser Thr 260	Thr Thr Pro Glu Lys 265	Leu Thr Leu Leu 270	Leu Ala Ala
Ser Gly Gln Ala Leu Thr 275	Ser Arg Met Arg Ala His 280	Pro Pro Arg Pro 285	
Ala His Leu Trp Gln Arg 290	Pro Leu 295		

<210> 28

<211> 32

<212> DNA

<213> künstliche sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(32)

<223>

<400> 28

tttttctcga gcgataaacg ctcacttggt ta

32

<210> 29

<211> 32

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(32)

<223>

<400> 29

tttttgtcga cacgttatgc tcacaacccc gg

32

<210> 30

<211> 679

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (87)..(635)

<223>

<400> 30

ctcgagcgat aaacgctcac ttggttaatc atttcactct tcaattatct ataatgatga

60

gtgatcagaa ttacatgtga gaaatt atg caa acg gaa cac gtc att tta ttg
 Met Gln Thr Glu His Val Ile Leu Leu
 1 5

113

aat gca cag gga gtt ccc acg ggt acg ctg gaa aag tat gcc gca cac
 Asn Ala Gln Gly Val Pro Thr Gly Thr Leu Glu Lys Tyr Ala Ala His

161

10	15	20	25	
acg gca gac acc cgc tta cat ctc gcg ttc tcc agt tgg ctg ttt aat	Thr Ala Asp Thr Arg Leu His Leu Ala Phe Ser Ser Trp Leu Phe Asn	209		
	30	35	40	
gcc aaa gga caa tta tta gtt acc cgc cgc gca ctg agc aaa aaa gca	Ala Lys Gly Gln Leu Leu Val Thr Arg Arg Ala Leu Ser Lys Lys Ala	257		
	45	50	55	
tgg cct ggc gtg tgg act aac tcg gtt tgt ggg cac cca caa ctg gga	Trp Pro Gly Val Trp Thr Asn Ser Val Cys Gly His Pro Gln Leu Gly	305		
	60	65	70	
gaa agc aac gaa gac gca gtg atc cgc cgt tgc cgt tat gag ctt ggc	Glu Ser Asn Glu Asp Ala Val Ile Arg Arg Cys Arg Tyr Glu Leu Gly	353		
	75	80	85	
gtg gaa att acg cct cct gaa tct atc tat cct gac ttt cgc tac cgc	Val Glu Ile Thr Pro Pro Glu Ser Ile Tyr Pro Asp Phe Arg Tyr Arg	401		
	90	95	100	
gcc acc gat ccg agt ggc att gtg gaa aat gaa gtg tgt ccg gta ttt	Ala Thr Asp Pro Ser Gly Ile Val Glu Asn Glu Val Cys Pro Val Phe	449		
	110	115	120	
gcc gca cgc acc act agt gcg tta cag atc aat gat gat gaa gtg atg	Ala Ala Arg Thr Thr Ser Ala Leu Gln Ile Asn Asp Asp Glu Val Met	497		
	125	130	135	
gat tat caa tgg tgt gat tta gca gat gta tta cac ggt att gat gcc	Asp Tyr Gln Trp Cys Asp Leu Ala Asp Val Leu His Gly Ile Asp Ala	545		
	140	145	150	
acg ccg tgg gcg ttc agt ccg tgg atg gtg atg cag gcg aca aat cgc	Thr Pro Trp Ala Phe Ser Pro Trp Met Val Met Gln Ala Thr Asn Arg	593		
	155	160	165	
gaa gcc aga aaa cga tta tct gca ttt acc cag ctt aaa taa	Glu Ala Arg Lys Arg Leu Ser Ala Phe Thr Gln Leu Lys	635		
	170	175	180	
aaaaaccccg acatttgccg gggttgtgag cataacgtgt cgac		679		

<210> 31

<211> 182

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 31

Met Gln Thr Glu His Val Ile Leu Leu Asn Ala Gln Gly Val Pro Thr
1 5 10 15

Gly Thr Leu Glu Lys Tyr Ala Ala His Thr Ala Asp Thr Arg Leu His
20 25 30

Leu Ala Phe Ser Ser Trp Leu Phe Asn Ala Lys Gly Gln Leu Leu Val
35 40 45

Thr Arg Arg Ala Leu Ser Lys Lys Ala Trp Pro Gly Val Trp Thr Asn
 50 55 60

Ser Val Cys Gly His Pro Gln Leu Gly Glu Ser Asn Glu Asp Ala Val
 65 70 75 80

Ile Arg Arg Cys Arg Tyr Glu Leu Gly Val Glu Ile Thr Pro Pro Glu
 85 90 95

Ser Ile Tyr Pro Asp Phe Arg Tyr Arg Ala Thr Asp Pro Ser Gly Ile
 100 105 110

Val Glu Asn Glu Val Cys Pro Val Phe Ala Ala Arg Thr Thr Ser Ala
 115 120 125

Leu Gln Ile Asn Asp Asp Glu Val Met Asp Tyr Gln Trp Cys Asp Leu
 130 135 140

Ala Asp Val Leu His Gly Ile Asp Ala Thr Pro Trp Ala Phe Ser Pro
 145 150 155 160

Trp Met Val Met Gln Ala Thr Asn Arg Glu Ala Arg Lys Arg Leu Ser
 165 170 175

Ala Phe Thr Gln Leu Lys
 180

<210> 32

<211> 31

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(31)

<223>

<400> 32
 tttttccatg gtgaaggagg aaatagcgaa a

31

<210> 33

<211> 32

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(32)

<223>

<400> 33

tttttaagct ttcacttttt tcttgtaacc aa

32

<210> 34

<211> 962

<212> DNA

<213> Archaeoglobus fulgidus

<220>

<221> CDS

<222> (3)..(956)

<223>

<400> 34

cc	atg	gtg	aag	gag	gaa	ata	gcg	aaa	agg	gcc	gaa	ata	atc	aac	aaa	47
	Met	Val	Lys	Glu	Glu	Ile	Ala	Lys	Arg	Ala	Glu	Ile	Ile	Asn	Lys	
1				5						10				15		

gcc	att	gaa	gag	ctt	ctg	ccc	gaa	agg	gag	ccg	att	gga	ctc	tac	aaa	95
Ala	Ile	Glu	Glu	Leu	Leu	Pro	Glu	Arg	Glu	Pro	Ile	Gly	Leu	Tyr	Lys	
				20					25					30		

gcc	gca	agg	cat	ctg	atc	aaa	gca	ggt	ggc	aag	agg	cta	agg	cct	gta	143
Ala	Ala	Arg	His	Leu	Ile	Lys	Ala	Gly	Gly	Lys	Arg	Leu	Arg	Pro	Val	
			35					40					45			

ata	agc	ctc	tta	gca	gtc	gaa	gcc	ctt	ggg	aaa	gac	tac	aga	aag	att	191
Ile	Ser	Leu	Leu	Ala	Val	Glu	Ala	Leu	Gly	Lys	Asp	Tyr	Arg	Lys	Ile	
		50					55					60				

atc	ccg	gct	gct	gtc	agc	att	gaa	aca	atc	cac	aac	ttc	acc	ctc	gtg	239
Ile	Pro	Ala	Ala	Val	Ser	Ile	Glu	Thr	Ile	His	Asn	Phe	Thr	Leu	Val	
	65					70					75					

cat	gac	gac	ata	atg	gac	agg	gac	gag	atg	agg	agg	gga	gtt	ccg	acg	287
His	Asp	Asp	Ile	Met	Asp	Arg	Asp	Glu	Met	Arg	Arg	Gly	Val	Pro	Thr	
80					85					90					95	

gta	cac	agg	gtt	tat	ggg	gaa	gcg	acg	gcc	att	tta	gca	ggc	gac	aca	335
Val	His	Arg	Val	Tyr	Gly	Glu	Ala	Thr	Ala	Ile	Leu	Ala	Gly	Asp	Thr	
				100					105					110		

ctc	ttt	gct	gaa	gcc	ttc	aag	ctg	ctg	aca	aag	tgc	gat	gtt	gag	agc	383
Leu	Phe	Ala	Glu	Ala	Phe	Lys	Leu	Leu	Thr	Lys	Cys	Asp	Val	Glu	Ser	

115										120					125					
gag	gga	atc	aga	aaa	gct	aca	gaa	atg	ctt	tcg	gac	gtt	tgc	ata	aaa	431				
Glu	Gly	Ile	Arg	Lys	Ala	Thr	Glu	Met	Leu	Ser	Asp	Val	Cys	Ile	Lys					
		130					135					140								
ata	tgc	gag	ggg	cag	tac	tac	gac	atg	agc	ttt	gag	aaa	aag	gag	agc	479				
Ile	Cys	Glu	Gly	Gln	Tyr	Tyr	Asp	Met	Ser	Phe	Glu	Lys	Lys	Glu	Ser					
	145					150					155									
gtt	tcc	gag	gag	gag	tat	ctc	agg	atg	gtc	gag	ctg	aag	acc	gga	gtg	527				
Val	Ser	Glu	Glu	Glu	Tyr	Leu	Arg	Met	Val	Glu	Leu	Lys	Thr	Gly	Val					
160					165					170					175					
ctg	att	gca	gct	tct	gca	gca	tta	cct	gcg	gtg	ctt	ttt	ggg	gag	agc	575				
Leu	Ile	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Leu	Pro	Ala	Val	Leu	Phe	Gly	Glu	Ser					
				180					185					190						
gag	gaa	att	gta	aag	gcg	ctg	tgg	gac	tac	gga	gtt	ctt	agc	ggt	att	623				
Glu	Glu	Ile	Val	Lys	Ala	Leu	Trp	Asp	Tyr	Gly	Val	Leu	Ser	Gly	Ile					
			195					200					205							
ggc	ttc	cag	atc	cag	gac	gac	ctg	ctt	gac	ctg	act	gag	gag	acc	gga	671				
Gly	Phe	Gln	Ile	Gln	Asp	Asp	Leu	Leu	Asp	Leu	Thr	Glu	Glu	Thr	Gly					
		210					215					220								
aag	gac	tgg	gga	agc	gac	ctg	ctt	aaa	ggg	aag	aaa	acc	ctg	att	gtc	719				
Lys	Asp	Trp	Gly	Ser	Asp	Leu	Leu	Lys	Gly	Lys	Lys	Thr	Leu	Ile	Val					
	225					230					235									
ata	aag	gcg	ttc	gaa	aag	gga	gtg	aag	cta	aag	acg	ttt	gga	aag	gaa	767				
Ile	Lys	Ala	Phe	Glu	Lys	Gly	Val	Lys	Leu	Lys	Thr	Phe	Gly	Lys	Glu					
240					245					250					255					
aag	gcg	gac	gtc	tct	gag	att	aga	gat	gat	atc	gaa	aag	tta	aga	gag	815				
Lys	Ala	Asp	Val	Ser	Glu	Ile	Arg	Asp	Asp	Ile	Glu	Lys	Leu	Arg	Glu					
				260					265					270						
tgt	ggt	gcg	att	gat	tac	gct	gcc	agc	atg	gca	aga	aag	atg	gct	gaa	863				
Cys	Gly	Ala	Ile	Asp	Tyr	Ala	Ala	Ser	Met	Ala	Arg	Lys	Met	Ala	Glu					
			275					280					285							
gag	gcg	aaa	aga	aag	ctc	gaa	gtt	ctg	cct	gaa	agc	aaa	gcc	aag	gaa	911				
Glu	Ala	Lys	Arg	Lys	Leu	Glu	Val	Leu	Pro	Glu	Ser	Lys	Ala	Lys	Glu					
		290					295					300								
aca	ctg	ctg	gaa	ctt	acc	gac	ttc	ttg	gtt	aca	aga	aaa	aag	tga		956				
Thr	Leu	Leu	Glu	Leu	Thr	Asp	Phe	Leu	Val	Thr	Arg	Lys	Lys							
	305					310					315									
aagctt																962				
<210>	35																			
<211>	317																			
<212>	PRT																			
<213>	Archaeoglobus fulgidus																			
<400>	35																			
Met	Val	Lys	Glu	Glu	Ile	Ala	Lys	Arg	Ala	Glu	Ile	Ile	Asn	Lys	Ala					
1				5					10					15						

Ile Glu Glu Leu₂₀ Leu Pro Glu Arg Glu₂₅ Pro Ile Gly Leu Tyr₃₀ Lys Ala
 Ala Arg His₃₅ Leu Ile Lys Ala Gly₄₀ Gly Lys Arg Leu Arg₄₅ Pro Val Ile
 Ser Leu₅₀ Leu Ala Val Glu Ala₅₅ Leu Gly Lys Asp Tyr₆₀ Arg Lys Ile Ile
 Pro Ala Ala Val Ser Ile₇₀ Glu Thr Ile His Asn₇₅ Phe Thr Leu Val His₈₀
 Asp Asp Ile Met Asp₈₅ Arg Asp Glu Met Arg Arg Gly Val Pro Thr Val₉₅
 His Arg Val Tyr₁₀₀ Gly Glu Ala Thr Ala₁₀₅ Ile Leu Ala Gly Asp₁₁₀ Thr Leu
 Phe Ala Glu₁₁₅ Ala Phe Lys Leu Leu₁₂₀ Thr Lys Cys Asp Val₁₂₅ Glu Ser Glu
 Gly Ile₁₃₀ Arg Lys Ala Thr Glu₁₃₅ Met Leu Ser Asp Val₁₄₀ Cys Ile Lys Ile
 Cys Glu Gly Gln Tyr Tyr₁₅₀ Asp Met Ser Phe Glu₁₅₅ Lys Lys Glu Ser Val₁₆₀
 Ser Glu Glu Glu Tyr₁₆₅ Leu Arg Met Val Glu₁₇₀ Leu Lys Thr Gly Val₁₇₅ Leu
 Ile Ala Ala Ser₁₈₀ Ala Ala Leu Pro Ala₁₈₅ Val Leu Phe Gly Glu₁₉₀ Ser Glu
 Glu Ile Val₁₉₅ Lys Ala Leu Trp Asp₂₀₀ Tyr Gly Val Leu Ser₂₀₅ Gly Ile Gly
 Phe Gln Ile Gln Asp Asp Leu₂₁₅ Leu Asp Leu Thr Glu₂₂₀ Glu Thr Gly Lys
 Asp Trp Gly Ser Asp Leu₂₃₀ Leu Lys Gly Lys Lys₂₃₅ Thr Leu Ile Val Ile₂₄₀
 Lys Ala Phe Glu Lys₂₄₅ Gly Val Lys Leu Lys₂₅₀ Thr Phe Gly Lys Glu₂₅₅ Lys
 Ala Asp Val Ser₂₆₀ Glu Ile Arg Asp Asp₂₆₅ Ile Glu Lys Leu Arg₂₇₀ Glu Cys
 Gly Ala Ile₂₇₅ Asp Tyr Ala Ala Ser₂₈₀ Met Ala Arg Lys Met₂₈₅ Ala Glu Glu

Ala Lys Arg Lys Leu Glu Val Leu Pro Glu Ser Lys Ala Lys Glu Thr
 290 295 300

Leu Leu Glu Leu Thr Asp Phe Leu Val Thr Arg Lys Lys
 305 310 315

<210> 36

<211> 1293

<212> DNA

<213> Archaeoglobus fulgidus

<220>

<221> CDS

<222> (206)..(1159)

<223>

<400> 36
 taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaat tgggtaccgg 60
 gccccccctc gacgccgtcg ttcaatgaga atggataaga ggctcgtggg attgacgtga 120
 gggggcaggg atggctatat ttctgggagc gaactccggg cgaggatcta gttgtaggga 180
 gggattcatg acaccacaaa cagcc atg gtg aag gag gaa ata gcg aaa agg 232
 Met Val Lys Glu Glu Ile Ala Lys Arg
 1 5
 gcc gaa ata atc aac aaa gcc att gaa gag ctt ctg ccc gaa agg gag 280
 Ala Glu Ile Ile Asn Lys Ala Ile Glu Glu Leu Leu Pro Glu Arg Glu
 10 15 20 25
 ccg att gga ctc tac aaa gcc gca agg cat ctg atc aaa gca ggt ggc 328
 Pro Ile Gly Leu Tyr Lys Ala Ala Arg His Leu Ile Lys Ala Gly Gly
 30 35 40
 aag agg cta agg cct gta ata agc ctc tta gca gtc gaa gcc ctt ggg 376
 Lys Arg Leu Arg Pro Val Ile Ser Leu Leu Ala Val Glu Ala Leu Gly
 45 50 55
 aaa gac tac aga aag att atc ccg gct gct gtc agc att gaa aca atc 424
 Lys Asp Tyr Arg Lys Ile Ile Pro Ala Ala Val Ser Ile Glu Thr Ile
 60 65 70
 cac aac ttc acc ctc gtg cat gac gac ata atg gac agg gac gag atg 472
 His Asn Phe Thr Leu Val His Asp Asp Ile Met Asp Arg Asp Glu Met
 75 80 85
 agg agg gga gtt ccg acg gta cac agg gtt tat ggg gaa gcg acg gcc 520
 Arg Arg Gly Val Pro Thr Val His Arg Val Tyr Gly Glu Ala Thr Ala
 90 95 100 105
 att tta gca ggc gac aca ctc ttt gct gaa gcc ttc aag ctg ctg aca 568
 Ile Leu Ala Gly Asp Thr Leu Phe Ala Glu Ala Phe Lys Leu Leu Thr
 110 115 120

aag tgc gat gtt gag agc gag gga atc aga aaa gct aca gaa atg ctt Lys Cys Asp Val Glu Ser Glu Gly Ile Arg Lys Ala Thr Glu Met Leu 125 130 135	616
tcg gac gtt tgc ata aaa ata tgc gag ggg cag tac tac gac atg agc Ser Asp Val Cys Ile Lys Ile Cys Glu Gly Gln Tyr Tyr Asp Met Ser 140 145 150	664
ttt gag aaa aag gag agc gtt tcc gag gag gag tat ctc agg atg gtc Phe Glu Lys Lys Glu Ser Val Ser Glu Glu Glu Tyr Tyr Leu Arg Met Val 155 160 165	712
gag ctg aag acc gga gtg ctg att gca gct tct gca gca tta cct gcg Glu Leu Lys Thr Gly Val Leu Ile Ala Ala Ser Ala Ala Leu Pro Ala 170 175 180 185	760
gtg ctt ttt ggg gag agc gag gaa att gta aag gcg ctg tgg gac tac Val Leu Phe Gly Glu Ser Glu Glu Ile Val Lys Ala Leu Trp Asp Tyr 190 195 200	808
gga gtt ctt agc ggt att ggc ttc cag atc cag gac gac ctg ctt gac Gly Val Leu Ser Gly Ile Gly Phe Gln Ile Gln Asp Asp Leu Leu Asp 205 210 215	856
ctg act gag gag acc gga aag gac tgg gga agc gac ctg ctt aaa ggg Leu Thr Glu Glu Thr Gly Lys Asp Trp Gly Ser Asp Leu Leu Lys Gly 220 225 230	904
aag aaa acc ctg att gtc ata aag gcg ttc gaa aag gga gtg aag cta Lys Lys Thr Leu Ile Val Ile Lys Ala Phe Glu Lys Gly Val Lys Leu 235 240 245	952
aag acg ttt gga aag gaa aag gcg gac gtc tct gag att aga gat gat Lys Thr Phe Gly Lys Glu Lys Ala Asp Val Ser Glu Ile Arg Asp Asp 250 255 260 265	1000
atc gaa aag tta aga gag tgt ggt gcg att gat tac gct gcc agc atg Ile Glu Lys Leu Arg Glu Cys Gly Ala Ile Asp Tyr Ala Ala Ser Met 270 275 280	1048
gca aga aag atg gct gaa gag gcg aaa aga aag ctc gaa gtt ctg cct Ala Arg Lys Met Ala Glu Glu Ala Lys Arg Lys Leu Glu Val Leu Pro 285 290 295	1096
gaa agc aaa gcc aag gaa aca ctg ctg gaa ctt acc gac ttc ttg gtt Glu Ser Lys Ala Lys Glu Thr Leu Leu Glu Leu Thr Asp Phe Leu Val 300 305 310	1144
aca aga aaa aag tga aagcttcaat tgcattgctct agatgatcaa agaattcctg Thr Arg Lys Lys 315	1199
gcctagtcta taggaggttt tgaaaagaaa ggagcaataa tcatttttctt gttctatcaa	1259
gaggggtgcta ttgctccttt ctttttttct cgag	1293

<210> 37

<211> 317

<212> PRT

<213> Archaeoglobus fulgidus

<400> 37

Met Val Lys Glu Glu Ile Ala Lys Arg Ala Glu Ile Ile Asn Lys Ala
 1 5 10 15
 Ile Glu Glu Leu Leu Pro Glu Arg Glu Pro Ile Gly Leu Tyr Lys Ala
 20 25 30
 Ala Arg His Leu Ile Lys Ala Gly Gly Lys Arg Leu Arg Pro Val Ile
 35 40 45
 Ser Leu Leu Ala Val Glu Ala Leu Gly Lys Asp Tyr Arg Lys Ile Ile
 50 55 60
 Pro Ala Ala Val Ser Ile Glu Thr Ile His Asn Phe Thr Leu Val His
 65 70 75 80
 Asp Asp Ile Met Asp Arg Asp Glu Met Arg Arg Gly Val Pro Thr Val
 85 90 95
 His Arg Val Tyr Gly Glu Ala Thr Ala Ile Leu Ala Gly Asp Thr Leu
 100 105 110
 Phe Ala Glu Ala Phe Lys Leu Leu Thr Lys Cys Asp Val Glu Ser Glu
 115 120 125
 Gly Ile Arg Lys Ala Thr Glu Met Leu Ser Asp Val Cys Ile Lys Ile
 130 135 140
 Cys Glu Gly Gln Tyr Tyr Asp Met Ser Phe Glu Lys Lys Glu Ser Val
 145 150 155 160
 Ser Glu Glu Glu Tyr Leu Arg Met Val Glu Leu Lys Thr Gly Val Leu
 165 170 175
 Ile Ala Ala Ser Ala Ala Leu Pro Ala Val Leu Phe Gly Glu Ser Glu
 180 185 190
 Glu Ile Val Lys Ala Leu Trp Asp Tyr Gly Val Leu Ser Gly Ile Gly
 195 200 205
 Phe Gln Ile Gln Asp Asp Leu Leu Asp Leu Thr Glu Glu Thr Gly Lys
 210 215 220
 Asp Trp Gly Ser Asp Leu Leu Lys Gly Lys Lys Thr Leu Ile Val Ile
 225 230 235 240
 Lys Ala Phe Glu Lys Gly Val Lys Leu Lys Thr Phe Gly Lys Glu Lys
 245 250 255
 Ala Asp Val Ser Glu Ile Arg Asp Asp Ile Glu Lys Leu Arg Glu Cys
 260 265 270

Gly Ala Ile Asp Tyr Ala Ala Ser Met Ala Arg Lys Met Ala Glu Glu
 275 280 285

Ala Lys Arg Lys Leu Glu Val Leu Pro Glu Ser Lys Ala Lys Glu Thr
 290 295 300

Leu Leu Glu Leu Thr Asp Phe Leu Val Thr Arg Lys Lys
 305 310 315

<210> 38

<211> 35

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(35)

<223>

<400> 38
 gagctcttca ttatttcgat tttgatttcg tgacc

35

<210> 39

<211> 44

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(44)

<223>

<400> 39
 aagcttgagc tcggttgatc agaagaagaa gaagaagatg aact

44

<210> 40

<211> 653

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(653)

<223>

<400> 40

```

gagctcttca ttatttcgat tttgatttcg tgaccagcga acgcagaata ccttgttgtg      60
taatacttta cccgtgtaaa tcaaaaacaa aaaggctttt gagctttttg tagttgaatt      120
tctctggctg atcttttctg tacagattca tatactctgca gagacgatat cattgattat      180
ttgagcttct tttgaactat ttcgtgtaat ttgggatgag agctctatgt atgtgtgtaa      240
actttgaaga caacaagaaa ggtaacaagt gagggaggga tgactccatg tcaaaataga      300
tgtcataaga ggcccatcaa taagtgcttg agcccatag ctagcccagt aactaccaga      360
ttgtgagatg gatgtgtgaa cagttttttt ttgatgtag gactgaaatg tgaacaacag      420
gcgcatgaaa ggctaaatta ggacaatgat aagcagaaat aacttatcct ctctaact      480
tggcctcaca ttgcccttca cacaatccac acacatcaa tcacaacctc atcatatatc      540
tcccgcta atcttttttct ttgatctttt ttttttgct tattattttt ttgactttga      600
tctccatca gttcatcttc ttcttcttct tctgatcaac cgagctcaag ctt          653

```

<210> 41

<211> 28

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 41

```

gagctcactc actgatttcc attgcttg      28

```

<210> 42

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(30)

<223>

<400> 42

aagcttgagc tctttgttga agagatttgg

30

<210> 43

<211> 37

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(37)

<223>

<400> 43

cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc

37

<210> 44

<211> 34

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(34)

<223>

<400> 44

atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac

34

<210> 45

<211> 783

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(783)

<223>

<400> 45

gagctcactc actgatttcc attgcttgaa aattgatgat gaactaagat caatccatgt	60
tagtttcaaa acaacagtaa ctgtggccaa cttagttttg aaacaacact aactggtcga	120
agcaaaaaga aaaaagagtt tcatcatata tctgatttga tggactgttt ggagtttagga	180
ccaaacatta tctacaaaca aagacttttc tcctaacttg tgattccttc ttaaacccta	240
ggggtaatat tctatttttcc aaggatcttt agttaaaggc aaatccggga aattattgta	300
atcatttggg gaaacatata aaagatttga gttagatgga agtgacgatt aatccaaaca	360
tatatatctc tttctttcta tttcccaaata taacagacaa aagtagaata ttggctttta	420
acaccaatat aaaaacttgc ttcacaccta aacacttttg tttacttttag ggtaagtgca	480
aaaagccaac caaatccacc tgcactgatt tgacgtttac aaacgccgtt aagtcgatgt	540
ccgttgattt aaacagtgtc ttgtaattaa aaaaatcagt ttacataaat ggaaaattta	600
tcacttagtt ttcatcaact tctgaactta cttttcatgg attaggcaat actttccatt	660
tttagtaact caagtggacc ctttacttct tcaactccat ctctctcttt ctatttcact	720
tctttcttct cattatatct cttgtcctct ccaccaaatc tcttcaacaa agagctcaag	780
ctt	783

<210> 46

<211> 804

<212> DNA

<213> *Synechococcus* WH8102

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(804)

<223>

<400> 46

atg Met 1	aaa Lys	acg Thr	aca Thr	aga Arg 5	tct Ser	att Ile	tcg Ser	tgg Trp	cca Pro 10	tcg Ser	act Thr	tgc Cys	tgg Trp	cat His 15	cac His	48
cag Gln	ccg Pro	agt Ser	tgc Cys 20	tca Ser	agc Ser	tgg Trp	gtg Val	gca Ala 25	aat Asn	gag Glu	ttc Phe	agc Ser	cct Pro 30	cag Gln	gcc Ala	96
ctc Leu	aaa Lys	ggg Gly 35	ttg Leu	gct Ala	ctg Leu	gct Ala	ggg Gly 40	ctg Leu	att Ile	gga Gly	tca Ser	gcc Ala 45	tgg Trp	ctg Leu	ctc Leu	144
tcc Ser	ctg Leu 50	ggc Gly	ctg Leu	agc Ser	tac Tyr	acc Thr 55	ctg Leu	cca Pro	ctt Leu	gat Asp	cag Gln 60	acg Thr	cct Pro	ggg Gly	ctg Leu	192
ttg Leu 65	att Ile	ggc Gly	agc Ser	ttg Leu	att Ile 70	ctg Leu	ctc Leu	aga Arg	gca Ala	ttt Phe 75	ctg Leu	cac His	acc Thr	ggg Gly	ctg Leu 80	240
ttc Phe	atc Ile	gtt Val	gcc Ala	cac His 85	gat Asp	tcc Ser	atg Met	cac His	gcc Ala 90	agt Ser	ctg Leu	gtt Val	ccg Pro	ggg Gly 95	cat His	288
ccc Pro	gga Gly	ttg Leu	aac Asn 100	cgc Arg	tgg Trp	atc Ile	ggc Gly	aaa Lys 105	gtg Val	tat Tyr	ttg Leu	ttg Leu	gtg Val 110	tat Tyr	gca Ala	336
ggc Gly	ttg Leu	tct Ser 115	tat Tyr	gag Glu	cgt Arg	tgt Cys	tcc Ser 120	cgc Arg	aac Asn	cac His	aga Arg	cgt Arg 125	cat His	cac His	ctg Leu	384
gca Ala 130	ccg Pro	gag Glu	acg Thr	ttc Phe	cag Gln	gat Asp 135	cct Pro	gac Asp	tac Tyr	caa Gln	cgt Arg 140	tgc Cys	acc Thr	aat Asn	aac Asn	432
aac Asn 145	atc Ile	cta Leu	gat Asp	tgg Trp	tat Tyr 150	gtt Val	cac His	ttc Phe	atg Met	ggc Gly 155	aac Asn	tat Tyr	ctg Leu	ggc Gly	atg Met 160	480
cgg Arg	caa Gln	ctg Leu	tta Leu	aat Asn 165	cta Leu	agc Ser	tgt Cys	ctt Leu	tgg Trp 170	ctg Leu	gcg Ala	cta Leu	atc Ile	att Ile 175	ctc Leu	528
aac Asn	ggg Gly	tct Ser	gat Asp 180	ctc Leu	cct Pro	gct Ala	cag Gln	atc Ile 185	atg Met	cat His	ctg Leu	ctg Leu	ttg Leu 190	ttc Phe	agc Ser	576
gtt Val	ctg Leu	ccg Pro 195	ttg Leu	atc Ile	atc Ile	agt Ser	tcc Ser 200	tgt Cys	caa Gln	ttg Leu	ttt Phe	cta Leu 205	gtg Val	gga Gly	acc Thr	624
tgg Trp 210	tta Leu	ccc Pro	cac His	cga Arg	cgt Arg	ggg Gly 215	gcc Ala	acg Thr	aca Thr	cga Arg	ccg Pro 220	ggc Gly	gtg Val	aca Thr	acg Thr	672
cgc Arg 225	agc Ser	ctg Leu	gct Ala	ttg Leu	cat His 230	cca Pro	gcc Ala	ctc Leu	tct Ser	ttc Phe 235	gca Ala	gct Ala	tgt Cys	tac Tyr	aac Asn 240	720
ttt Phe	ggc Gly	tat Tyr	cat His	cgt Arg 245	gaa Glu	cat His	cat His	gaa Glu	tcg Ser 250	cct Pro	tcc Ser	aca Thr	ccc Pro	tgg Trp 255	ttt Phe	768
cag Gln	ctg Leu	cca Pro	caa Gln 260	ctt Leu	cga Arg	aat Asn	gaa Glu	tca Ser 265	ttc Phe	act Thr	tga					804

<210> 47

<211> 267

<212> PRT

<213> Synechococcus WH8102

<400> 47

Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His
1 5 10 15

Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala
20 25 30

Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu
35 40 45

Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu
50 55 60

Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe Leu His Thr Gly Leu
65 70 75 80

Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His
85 90 95

Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala
100 105 110

Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu
115 120 125

Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn
130 135 140

Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met
145 150 155 160

Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu
165 170 175

Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser
180 185 190

Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr
195 200 205

Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr
210 215 220

Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn
 225 230 235 240

Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe
 245 250 255

Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr
 260 265

<210> 48

<211> 804

<212> DNA

<213> Künstliche Variante

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(804)

<223>

<400> 48

atg aaa acg aca aga tct att tcg tgg cca tcg act tgc tgg cat cac	48
Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His	
1 5 10 15	
cag ccg agt tgc tca agc tgg gtg gca aat gag ttc agc cct cag gcc	96
Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala	
20 25 30	
ctc aaa ggg ttg gct ctg gct ggt ctg att gga tca gcc tgg ctg ctc	144
Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu	
35 40 45	
tcc ctg ggc ctg agc tac acc ctg cca ctt gat cag acg cct ggg ctg	192
Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu	
50 55 60	
ttg att ggc agc ttg att ctg tgg cag acc ttt ctg cac acc ggg ctg	240
Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Trp Gln Thr Phe Leu His Thr Gly Leu	
65 70 75 80	
ttc atc gtt gcc cac gat tcc atg cac gcc agt ctg gtt ccg ggt cat	288
Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His	
85 90 95	
ccc gga ttg aac cgc tgg atc ggc aaa gtg tat ttg ttg gtg tat gca	336
Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala	
100 105 110	
ggc ttg tct tat gag cgt tgt tcc cgc aac cac aga cgt cat cac ctg	384
Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu	
115 120 125	
gca ccg gag acg ttc cag gat cct gac tac caa cgt tgc acc aat aac	432
Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn	

130	135	140	
aac atc cta gat tgg tat gtt cac ttc atg ggc aac tat ctg ggc atg Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met 145 150 155 160			480
cgg caa ctg tta aat cta agc tgt ctt tgg ctg gcg cta atc att ctc Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu 165 170 175			528
aac ggt tct gat ctc cct gct cag atc atg cat ctg ctg ttg ttc agc Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser 180 185 190			576
gtt ctg ccg ttg atc atc agt tcc tgt caa ttg ttt cta gtg gga acc Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr 195 200 205			624
tgg tta ccc cac cga cgt ggg gcc acg aca cga ccg ggc gtg aca acg Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr 210 215 220			672
cgc agc ctg gct ttg cat cca gcc ctc tct ttc gca gct tgt tac aac Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn 225 230 235 240			720
ttt ggc tat cat cgt gaa cat cat gaa tcg cct tcc aca ccc tgg ttt Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe 245 250 255			768
cag ctg cca caa ctt cga aat gaa tca ttc act tga Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr 260 265			804

<210> 49

<211> 267

<212> PRT

<213> Künstliche Variante

<400> 49

Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His
1 5 10 15

Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala
20 25 30

Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu
35 40 45

Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu
50 55 60

Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Trp Gln Thr Phe Leu His Thr Gly Leu
65 70 75 80

Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His

85

90

95

Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala
 100 105 110

Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu
 115 120 125

Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn
 130 135 140

Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met
 145 150 155 160

Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu
 165 170 175

Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser
 180 185 190

Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr
 195 200 205

Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr
 210 215 220

Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn
 225 230 235 240

Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe
 245 250 255

Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr
 260 265

<210> 50

<211> 804

<212> DNA

<213> Künstliche Variante

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(804)

<223>

<400> 50

atg	aaa	acg	aca	aga	tct	att	tcg	tgg	cca	tcg	act	tgc	tgg	cat	cac	48
Met	Lys	Thr	Thr	Arg	Ser	Ile	Ser	Trp	Pro	Ser	Thr	Cys	Trp	His	His	
1				5					10					15		
cag	ccg	agt	tgc	tca	agc	tgg	gtg	gca	aat	gag	ttc	agc	cct	cag	gcc	96
Gln	Pro	Ser	Cys	Ser	Ser	Trp	Val	Ala	Asn	Glu	Phe	Ser	Pro	Gln	Ala	
			20					25					30			
ctc	aaa	ggg	ttg	gct	ctg	gct	ggg	ctg	att	gga	tca	gcc	tgg	ctg	ctc	144
Leu	Lys	Gly	Leu	Ala	Leu	Ala	Gly	Leu	Ile	Gly	Ser	Ala	Trp	Leu	Leu	
		35					40					45				
tcc	ctg	ggc	ctg	agc	tac	acc	ctg	cca	ctt	gat	cag	acg	cct	ggg	ctg	192
Ser	Leu	Gly	Leu	Ser	Tyr	Thr	Leu	Pro	Leu	Asp	Gln	Thr	Pro	Gly	Leu	
	50					55					60					
ttg	att	ggc	agc	ttg	att	ctg	ctc	aga	gca	ttt	ctg	cac	acc	ggg	ctg	240
Leu	Ile	Gly	Ser	Leu	Ile	Leu	Leu	Arg	Ala	Phe	Leu	His	Thr	Gly	Leu	
65					70					75				80		
ttc	atc	gtt	gcc	cac	gat	tcc	atg	cac	gcc	agt	ctg	gtt	ccg	ggt	cat	288
Phe	Ile	Val	Ala	His	Asp	Ser	Met	His	Ala	Ser	Leu	Val	Pro	Gly	His	
				85					90					95		
ccc	gga	ttg	aac	cgc	tgg	atc	ggc	aaa	gtg	tat	ttg	ttg	gtg	tat	gca	336
Pro	Gly	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Gly	Lys	Val	Tyr	Leu	Leu	Val	Tyr	Ala	
			100					105					110			
ggc	ttg	tct	tat	gag	cgt	tgt	tcc	cgc	aac	cac	aga	cgt	cat	cac	gga	384
Gly	Leu	Ser	Tyr	Glu	Arg	Cys	Ser	Arg	Asn	His	Arg	Arg	His	His	Gly	
		115					120					125				
cat	cct	ggt	act	gat	tta	gat	cct	gac	tac	caa	cgt	tgc	acc	aat	aac	432
His	Pro	Gly	Thr	Asp	Leu	Asp	Pro	Asp	Tyr	Gln	Arg	Cys	Thr	Asn	Asn	
	130					135					140					
aac	atc	cta	gat	tgg	tat	gtt	cac	ttc	atg	ggc	aac	tat	ctg	ggc	atg	480
Asn	Ile	Leu	Asp	Trp	Tyr	Val	His	Phe	Met	Gly	Asn	Tyr	Leu	Gly	Met	
145					150					155					160	
cgg	caa	ctg	tta	aat	cta	agc	tgt	ctt	tgg	ctg	gcg	cta	atc	att	ctc	528
Arg	Gln	Leu	Leu	Asn	Leu	Ser	Cys	Leu	Trp	Leu	Ala	Leu	Ile	Ile	Leu	
				165					170					175		
aac	ggt	tct	gat	ctc	cct	gct	cag	atc	atg	cat	ctg	ctg	ttg	ttc	agc	576
Asn	Gly	Ser	Asp	Leu	Pro	Ala	Gln	Ile	Met	His	Leu	Leu	Leu	Phe	Ser	
			180					185					190			
gtt	ctg	ccg	ttg	atc	atc	agt	tcc	tgt	caa	ttg	ttt	cta	gtg	gga	acc	624
Val	Leu	Pro	Leu	Ile	Ile	Ser	Ser	Cys	Gln	Leu	Phe	Leu	Val	Gly	Thr	
		195					200					205				
tgg	tta	ccc	cac	cga	cgt	ggg	gcc	acg	aca	cga	ccg	ggc	gtg	aca	acg	672
Trp	Leu	Pro	His	Arg	Arg	Gly	Ala	Thr	Thr	Arg	Pro	Gly	Val	Thr	Thr	
	210					215					220					
cgc	agc	ctg	gct	ttg	cat	cca	gcc	ctc	tct	ttc	gca	gct	tgt	tac	aac	720
Arg	Ser	Leu	Ala	Leu	His	Pro	Ala	Leu	Ser	Phe	Ala	Ala	Cys	Tyr	Asn	
225					230					235					240	
ttt	ggc	tat	cat	cgt	gaa	cat	cat	gaa	tcg	cct	tcc	aca	ccc	tgg	ttt	768
Phe	Gly	Tyr	His	Arg	Glu	His	His	Glu	Ser	Pro	Ser	Thr	Pro	Trp	Phe	
				245					250					255		
cag	ctg	cca	caa	ctt	cga	aat	gaa	tca	ttc	act	tga					804
Gln	Leu	Pro	Gln	Leu	Arg	Asn	Glu	Ser	Phe	Thr						
			260					265								

<210> 51

<211> 267

<212> PRT

<213> Künstliche Variante

<400> 51

Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His
 1 5 10 15

Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala
 20 25 30

Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu
 35 40 45

Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu
 50 55 60

Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe Leu His Thr Gly Leu
 65 70 75 80

Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His
 85 90 95

Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala
 100 105 110

Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Gly
 115 120 125

His Pro Gly Thr Asp Leu Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn
 130 135 140

Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met
 145 150 155 160

Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu
 165 170 175

Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser
 180 185 190

Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr
 195 200 205

Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr
 210 215 220

Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn
 225 230 235 240

Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe
 245 250 255

Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr
 260 265

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität aufweisen, und die veränderte Ketolase-Aktivität durch eine Ketolase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Organismen verwendet, die als Wildtyp bereits eine Ketolase-Aktivität aufweisen, und die genetische Veränderung eine Erhöhung der Ketolase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp bewirkt.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Ketolase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, gegenüber dem Wildtyp erhöht.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression Nukleinsäuren in den Organismus einbringt, die Ketolasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Organismen verwendet, die als Wildtyp keine Ketolase-Aktivität aufweisen und die genetische Veränderung eine Ketolase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp verursacht.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Organismen verwendet, die transgen eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, exprimieren.

7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Verursachung der Genexpression Nukleinsäuren in die Organismen einbringt, die Ketolasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

8. Verfahren nach Anspruch 5 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 1 einbringt.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Organismen zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Hydroxylase-Aktivität und β -Cyclase-Aktivität, aufweisen.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass man zur zusätzlichen Erhöhung mindestens einer der Aktivitäten, die Genexpression mindestens einer Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase, und Nukleinsäuren, kodierend eine β -Cyclase, gegenüber dem Wildtyp erhöht.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression mindestens eine Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und Nukleinsäuren kodierend eine β -Cyclase in den Organismus einbringt.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, Nukleinsäuren einbringt, die eine Hydroxylase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 16 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 16 aufweist.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 15 einbringt.

14. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, Nukleinsäuren einbringt, die eine β -Cyclase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 18 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 18 aufweist.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 17 einbringt.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass man nach dem Kultivieren die genetisch veränderten Organismen erntet und anschließend die Ketocarotinoide aus den Organismen isoliert.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet daß man als Organismus einen Organismus verwendet, der als Ausgangsorganismus natürlicherweise oder durch genetische Komplementation oder Umregulierung von Stoffwechselwegen in der Lage ist, Carotinoide herzustellen.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß man als Organismen Mikroorganismen oder Pflanzen verwendet.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß man als Mikroorganismen Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze verwendet.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen ausgewählt sind aus der Gruppe Escherichia, Erwinia, Agrobacterium, Flavobacterium, Alcaligenes, Paracoccus, Nostoc, Cyanobakterien der Gattung Synechocystis, Candida, Saccharomyces, Hansenula, Phaffia, Pichia, Aspergillus, Trichoderma, Ashbya, Neurospora, Blakeslea, Phycomyces, Fusarium, Haematococcus, Phaedactylum tricoma-tum, Volvox oder Dunaliella.

21. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß man als Organismus Pflanzen verwendet.

22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Liliaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Iliaceae oder Lamiaceae verwendet.

23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula, Acacia, Aconitum, Adonis, Arnica, Aquilegia, Aster, Astragalus, Bignonia, Calendula, Caltha, Campanula, Canna, Centaurea, Cheiranthus, Chrysanthemum, Citrus, Crepis, Crocus, Curcubita, Cytisus, Delonia, Delphinium, Dianthus, Dimorphotheca, Doronicum, Eschscholtria, Forsythia, Fremontia, Gazania, Gelsemium, Genista, Gentiana, Geranium, Gerbera, Geum, Grevillea, Helenium, Helianthus, Hepatica, Heracleum, Hisbiscus, Heliopsis, Hypericum, Hypochoeris, Impatiens, Iris, Jacaranda, Kerria, Labumum, Lathyrus, Leontodon, Lilium, Linum, Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Maratia, Medicago, Mimulus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinesis, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola

oder Zinnia verwendet.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Ketocarotinoide ausgewählt sind aus der Gruppe Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin.

25. Genetisch veränderter Organismus, wobei die genetische Veränderung die Aktivität einer Ketolase A für den Fall, dass der Wildtyporganismus bereits eine Ketolase-Aktivität aufweist, gegenüber dem Wildtyp erhöht und B für den Fall, dass der Wildtyporganismus keine Ketolase-Aktivität aufweist, gegenüber dem Wildtyp verursacht und die nach A erhöhte oder nach B verursachte Ketolase-Aktivität durch eine Ketolase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

26. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Erhöhung oder Verursachung der Ketolase-Aktivität durch eine Erhöhung oder Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, gegenüber dem Wildtyp bewirkt wird.

27. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung oder Verursachung der Genexpression Nukleinsäuren in den Organismus einbringt, die Ketolasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

28. Genetisch veränderter Organismus, enthaltend mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

29. Genetisch veränderter Organismus, enthaltend mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

30. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 29, dadurch gekennzeichnet, dass die genetische Veränderung zusätzlich mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Hydroxylase-Aktivität und β -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp erhöht.

31. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß er als Ausgangsorganismus natürlicherweise oder durch genetische Komplementierung in der Lage ist, Carotinoide herzustellen.

32. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 31, ausgewählt aus der Gruppe Mikroorganismen oder Pflanzen.

33. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen ausgewählt sind aus der Gruppe Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.

34. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen ausgewählt sind aus der Gruppe Escherichia, Erwinia, Agrobacterium, Flavobacterium, Alcaligenes, Paracoccus, Nostoc, Cyanobakterien der Gattung Synechocystis, Candida, Saccharomyces, Hansenula, Pichia, Aspergillus, Trichoderma, Ashbya, Neurospora, Blakeslea, Phycomyces, Fusarium, Haematococcus, Phaeddactylum tricomatum, Volvox oder Dunaliella.

35. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanzen ausge-

wählt sind aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassiceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Iliaceae oder Lamiaceae verwendet.

36. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, dass Pflanzen ausgewählt sind aus den Pflanzengattungen Marigold, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Acacia*, *Aconitum*, *Adonis*, *Arnica*, *Aquilegia*, *Aster*, *Astragalus*, *Bignonia*, *Calendula*, *Caltha*, *Campanula*, *Canna*, *Centaurea*, *Cheiranthus*, *Chrysanthemum*, *Citrus*, *Crepis*, *Crocus*, *Curcubita*, *Cytisus*, *Delonia*, *Delphinium*, *Dianthus*, *Dimorphotheca*, *Doronicum*, *Eschscholtzia*, *Forsythia*, *Fremontia*, *Gazania*, *Gelsemium*, *Genista*, *Gentiana*, *Geranium*, *Gerbera*, *Geum*, *Grevillea*, *Helenium*, *Helianthus*, *Hepatica*, *Heracleum*, *Hisbiscus*, *Heliopsis*, *Hypericum*, *Hypochoeris*, *Impatiens*, *Iris*, *Jacaranda*, *Kerria*, *Laburnum*, *Lathyrus*, *Leontodon*, *Lilium*, *Linum*, *Lotus*, *Lycopersicon*, *Lysimachia*, *Maratia*, *Medicago*, *Mimulus*, *Narcissus*, *Oenothera*, *Osmanthus*, *Petunia*, *Photinia*, *Physalis*, *Phyteuma*, *Potentilla*, *Pyracantha*, *Ranunculus*, *Rhododendron*, *Rosa*, *Rudbeckia*, *Senecio*, *Silene*, *Silphium*, *Sinapsis*, *Sorbus*, *Spartium*, *Tecoma*, *Torenia*, *Tragopogon*, *Trollius*, *Tropaeolum*, *Tulipa*, *Tussilago*, *Ulex*, *Viola* oder *Zinnia* verwendet.

37. Verwendung der genetisch veränderten Organismen nach einem der Ansprüche 25 bis 36 als Futter- oder Nahrungsmittel.

38. Verwendung der genetisch veränderten Organismen nach einem der Ansprüche 25 bis 36 zur Herstellung von Ketocarotinoid-haltigen Extrakten oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungsergänzungsmittel.

39. Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 8 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 8 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 4 nicht enthalten ist.

40. Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 6 aufweist.

41. Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 12 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 12 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 6 nicht enthalten ist.

42. Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 49 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 49 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 47 nicht enthalten ist.

43. Nukleinsäure, kodierend ein Protein gemäß einem der Ansprüche 39 bis 42, mit der Maßgabe, dass die Sequenz SEQ ID NO: 5 nicht enthalten ist.

44. Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 4 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.

45. Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 65% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 6 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.

46. Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 47 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 47 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Abbildung 1

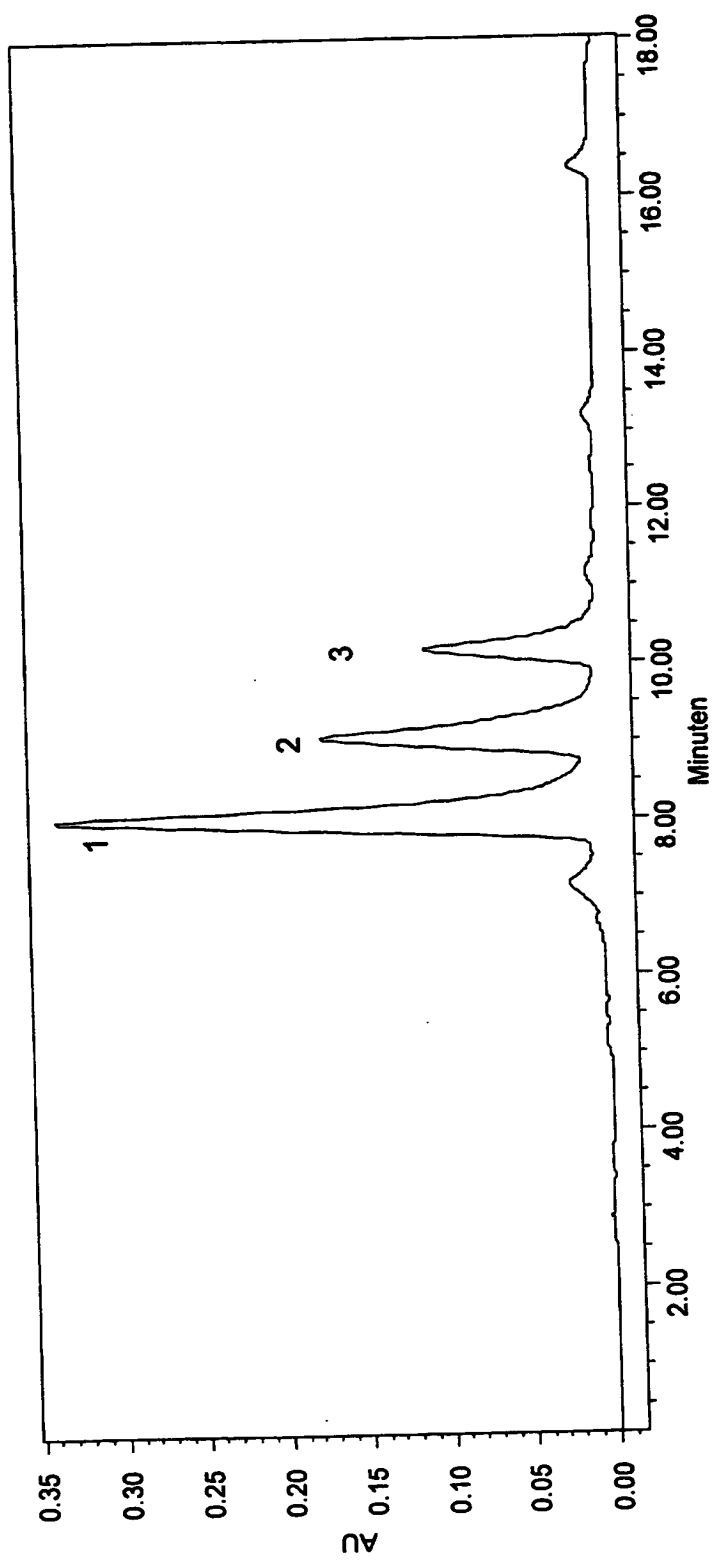
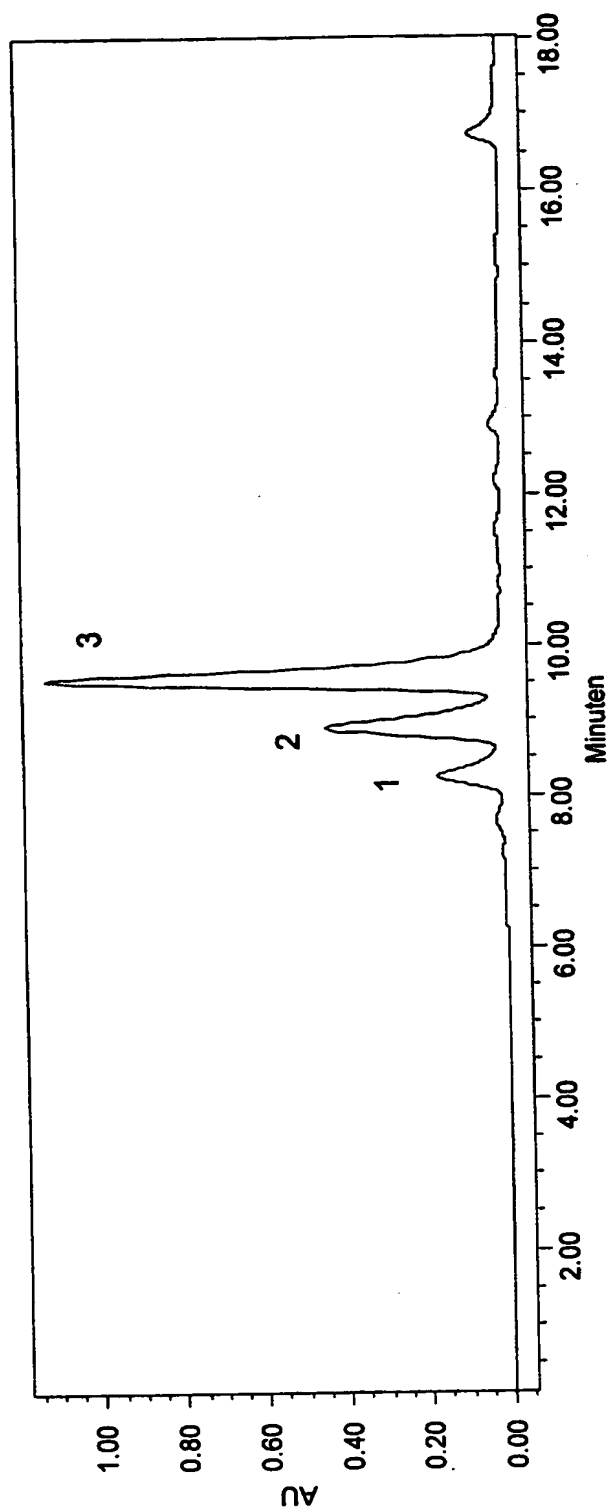
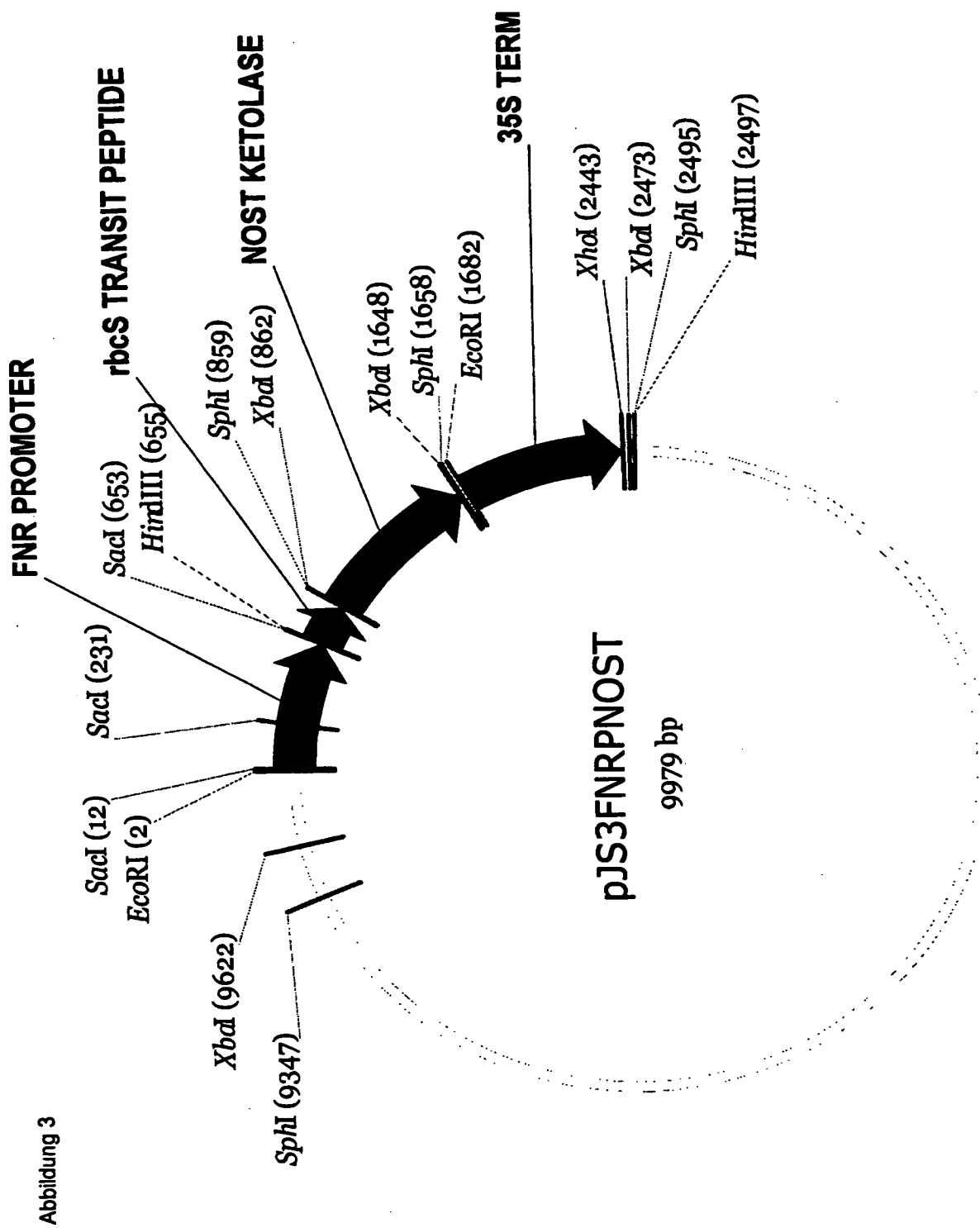


Abbildung 2





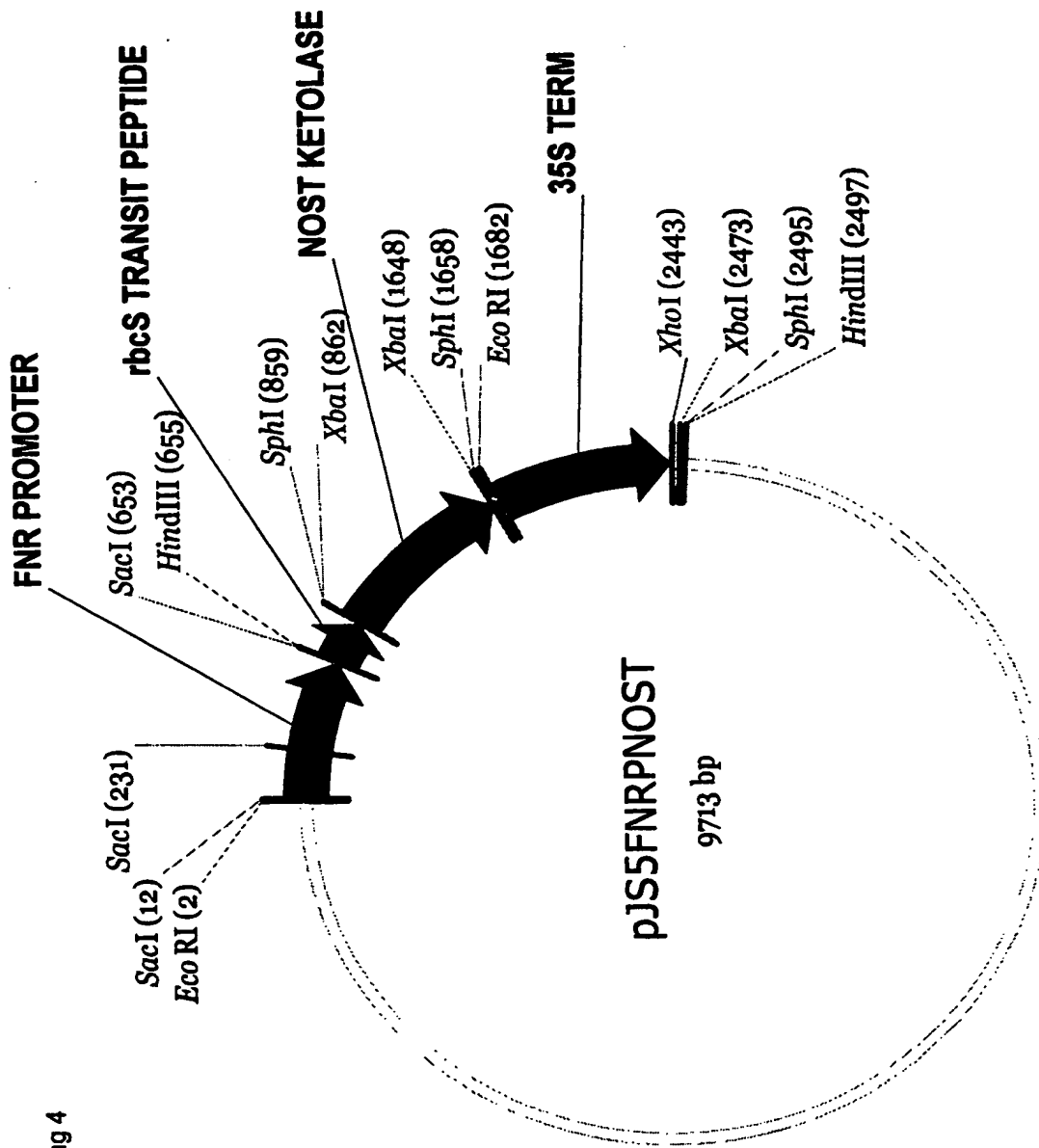


Abbildung 4

Abbildung 5

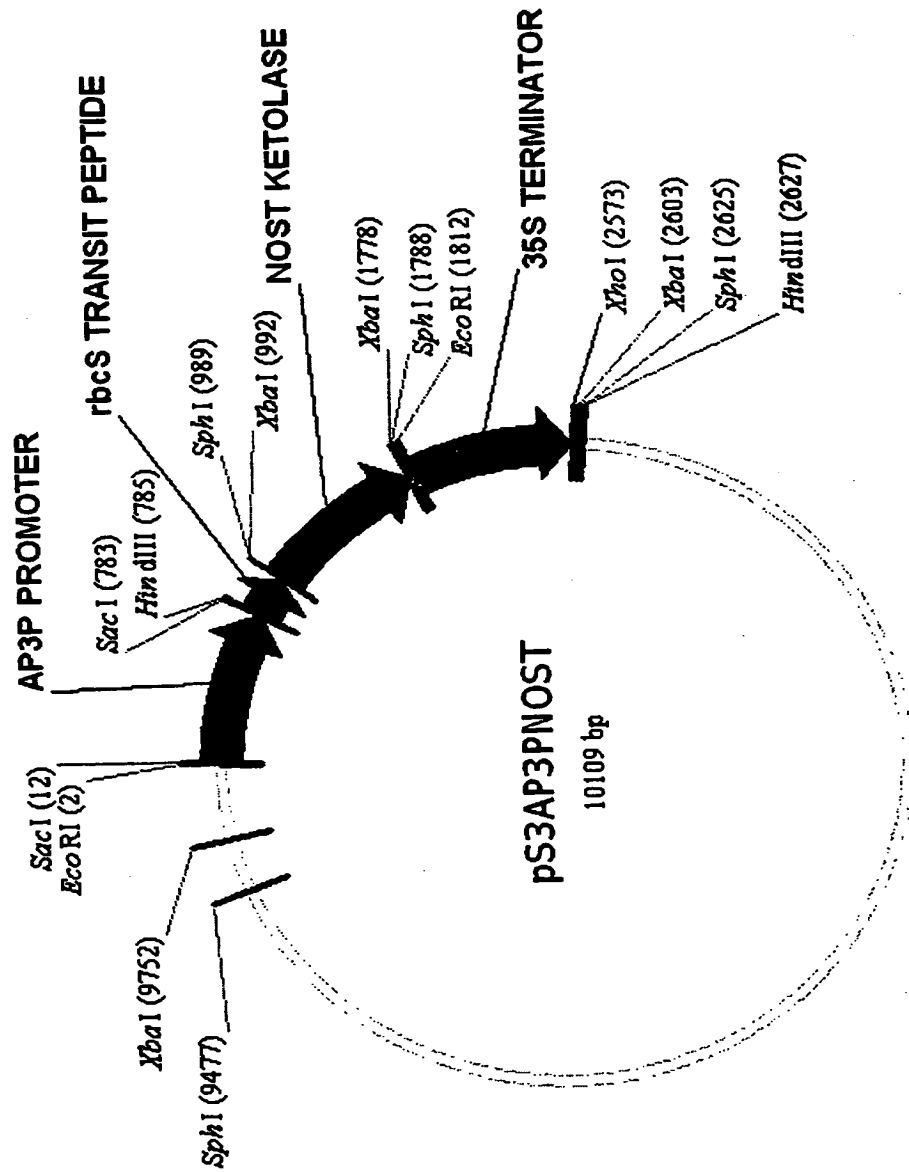
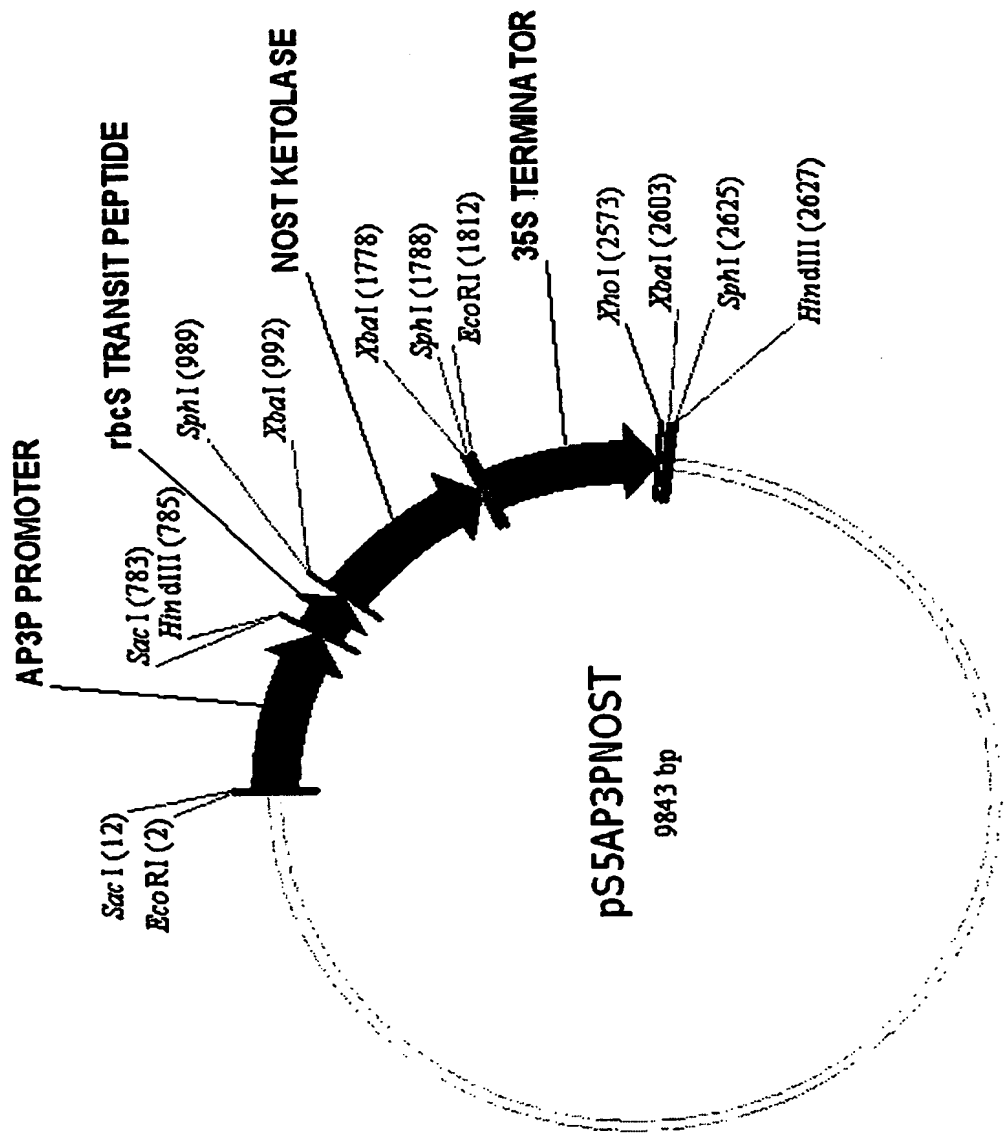


Abbildung 6



THIS PAGE BLANK (USPTO)